

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Terezie Herrmannová**

Role Wnt signalizace v interakci cirkadiánních hodin a buněčného cyklu  
The role of Wnt signaling in interaction between circadian clock and cell cycle

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Praha, 2020

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat své školitelce doc. PharmDr. Aleně Sumové, DSc. za její rady, ochotu a vstřícnost při zpracování této bakalářské práce.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. 5. 2020

Terezie Herrmannová

## Abstrakt

Wnt signalizace představuje vysoce konzervovanou kaskádu signální transdukce, která reguluje proliferaci a diferenciaci kmenových buněk. Hraje nezastupitelnou roli nejen během embryonálního vývoje, ale také při udržování homeostázy tkání dospělého organismu. Buněčné dělení je také ovlivňováno cirkadiánními hodinami. Hodiny mohou s buněčným cyklem interagovat buď přímo v rámci jedné buňky, nebo jej regulovat mezibuněčnou cestou. Aby mohly působit na buňky ve svém okolí, využívají Wnt signalizační dráhy, která zprostředkuje přenos signálu přes extracelulární prostor. Wnt signalizace i cirkadiánní hodiny jsou nezbytné pro fyziologické fungování savčího organismu, a jejich narušení může vést k rozvoji nádorových onemocnění.

**Klíčová slova:** cirkadiánní hodiny, hodinové geny, buněčný cyklus, Wnt signalizace, buněčná proliferace, rakovina

## Abstract

The Wnt signaling represents a highly conserved signal transduction cascade that regulates stem cell proliferation and differentiation. It plays an irreplaceable role not only during embryonic development, but also in maintaining homeostasis of adult tissues. The cell division is also influenced by the circadian clock. The clock can interact with the cell cycle either directly within a single cell or regulate it intercellularly. In order to impact surrounding cells, it uses the Wnt signaling pathway that mediates signal transduction through the extracellular space. Both Wnt signaling and the circadian clock are essential for the physiological functioning of the mammalian organism, and their disruption can lead to the development of cancer.

**Keywords:** circadian clock, clock genes, cell cycle, Wnt signaling, cell proliferation, cancer

## Seznam zkratek

ADHD	Attention-deficit/hyperactivity disorder
ALP	Alkaline phosphatase
APC	Adenomatous polyposis coli
Bmal1	Brain and muscle aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1
BSP	Bone sialoprotein
CDC25	Cell division cycle 25
CDK	Cyclin-dependent kinase
C/EBP $\alpha$	CCAAT/enhancer binding protein $\alpha$
CIP/KIP	CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein
CK1 $\alpha$	Casein kinase 1 $\alpha$
CKI	Cyclin-dependent kinase inhibitor protein
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput
c-Myc	Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
COL1 $\alpha$ 1	Collagen type I $\alpha$ 1
CRD	Cysteine-rich domain
Cry	Cryptochrome
Csnk1d/e	Gene encoding casein kinase 1 $\delta/\epsilon$
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
Cyc	Cyclin
Dbh	Dopamine $\beta$ -hydroxylase
Dkk3	Dickkopf-3
Dvl	Dishevelled
E2F	Early 2 factor
Fzd	Frizzled receptor
GADD45 $\alpha/\beta$	Growth arrest and DNA damage 45 $\alpha/\beta$
GSK3 $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 $\beta$
INK4	Inhibitors of CDK4
LEF	Lymphoid enhancer binding factor
LGR5	Leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6
Mao	Monoamine oxidase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

Myf5	Myogenic factor 5
MyoD1	Myogenic differentiation 1
OC	Osteocalcin
OSX	Osterix
PCP	Planar cell polarity
Per	Period
PER2::LUC	PERIOD2::LUCIFERASE fúzní protein
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
pRb	Retinoblastoma protein
ROR	Retinoic acid receptor-related orphan receptor
RORE	ROR response element
ROS	Reactive oxygen species
Runx2	Runt-related transcript factor 2
sFRP3	Secreted frizzled-related protein 3
shRNA	Short hairpin RNA
TBP	TATA-binding protein
TCF	T-cell transcription factor
TLE	Transducin-like Enhancer of split
$\beta$ -TrCP	$\beta$ -transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wee1	Small cell protein
Wnt	Wingless-type

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>BUNĚČNÝ CYKLUS .....</b>	<b>2</b>
2.1	CYKLIN-DEPENDENTNÍ PROTEIN KINÁZY .....	2
2.2	PROLIFERACE KMENOVÝCH BUNĚK.....	4
<b>3</b>	<b>WNT SIGNALIZACE .....</b>	<b>5</b>
3.1	KANONICKÁ DRÁHA WNT/B-KATENIN .....	5
3.2	CÍLOVÉ GENY SIGNALIZACE WNT/B-KATENIN .....	7
3.3	WNT DRÁHA A BUNĚČNÝ CYKLUS .....	7
<b>4</b>	<b>CIRKADIÁNNÍ HODINY .....</b>	<b>8</b>
4.1	MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS HODIN .....	8
4.2	HODINAMI ŘÍZENÉ GENY .....	10
4.3	CIRKADIÁNNÍ HODINY A BUNĚČNÝ CYKLUS.....	10
<b>5</b>	<b>WNT/B-KATENIN SIGNALIZACE JAKO PROSTŘEDNÍK MEZI HODINAMI A BUNĚČNÝM CYKLEM .....</b>	<b>12</b>
5.1	EPITEL TENKÉHO STŘEVA .....	13
5.2	TUKOVÁ TKÁŇ.....	15
5.3	SVALOVÁ TKÁŇ.....	17
5.4	KOSTNÍ TKÁŇ .....	19
5.5	FIBROBLASTY .....	21
5.6	EPIDERMIS .....	21
5.7	HEMATOPOETICKÝ SYSTÉM .....	23
5.8	NERVOVÁ TKÁŇ.....	24
<b>6</b>	<b>CIRKADIÁNNÍ HODINY, WNT SIGNALIZACE A NÁDOROVÉ BUJENÍ.....</b>	<b>26</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>28</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>29</b>

# 1 Úvod

Cirkadiánní hodiny v našem těle se vyvinuly jako adaptace na periodicky se opakující podmínky vnějšího prostředí, související se střídáním dne a noci. Pomáhají regulovat množství fyziologických a metabolických pochodů tak, aby k nim docházelo v určité fázi ~24hodinového cyklu (shrnutí v Sinturel, Petrenko and Dibner, 2020). Je známo, že změny v cirkadiánním rytmu se u člověka mohou projevit změnou jeho chování (Alvarez *et al.*, 1992) nebo zvýšeným rizikem rozvoje některých chorob (např. kardiovaskulárních; shrnutí v Akerstedt *et al.*, 1984). Ukázalo se také, že existuje i spojitost mezi narušením rytmů a vyšším výskytem rakoviny (Davis, Mirick and Stevens, 2001; Kubo *et al.*, 2006), tedy onemocnění zapříčiněného nekontrolovatelným dělením buněk, nejčastěji v důsledku narušení regulace buněčného cyklu.

V dnešní době již známe molekulární mechanismus jak cirkadiánních hodin, tak buněčného cyklu, a víme také do značné míry, jak spolu tyto dva biologické oscilátory interagují a vzájemně se ovlivňují. Dosud byla tato interakce zkoumána především na intracelulární úrovni, v posledních letech však vzrostl zájem také o jejich intercelulární propojení. Jednou z možností, jak k této mezibuněčné komunikaci mezi cirkadiánními hodinami a buněčným cyklem dochází, je zprostředkování skrz Wnt signalizaci (shrnutí v Matsu-ura, Moore and Hong, 2018).

Cílem této práce je shrnout výsledky studií, které se zabývaly rolí Wnt signalizace při zprostředkování signálu mezi cirkadiánními hodinami a buněčným cyklem. Pozornost je věnována především savcím modelovým organismům, jejichž pozorováním lze získat vědomosti nejlépe využitelné v klinické praxi. Úvodní část se zabývá stručným popisem molekulárního mechanismu buněčného cyklu, Wnt signalizace a cirkadiánních hodin. Následuje souhrn poznatků vyplývajících ze zkoumání jejich vzájemných interakcí, rozdělený podle typů tkání nebo buněk, ve kterých byly interakce pozorovány. Jak Wnt signalizace, tak cirkadiánní hodiny totiž vykazují tkáňovou specifitu. Na závěr se práce krátce věnuje tomu, jaký význam mají tyto studie pro pochopení vzniku a rozvoje nádorových onemocnění. Ta jsou v dnešní době velmi usilovně studována, jelikož se jedná o nemoc, která postihuje velkou část světové populace. Např. v roce 2018 bylo celosvětově zaznamenáno 18,1 milionů nových případů a 9,6 milionů úmrtí v důsledku rakoviny (Bray *et al.*, 2018).

## 2 Buněčný cyklus

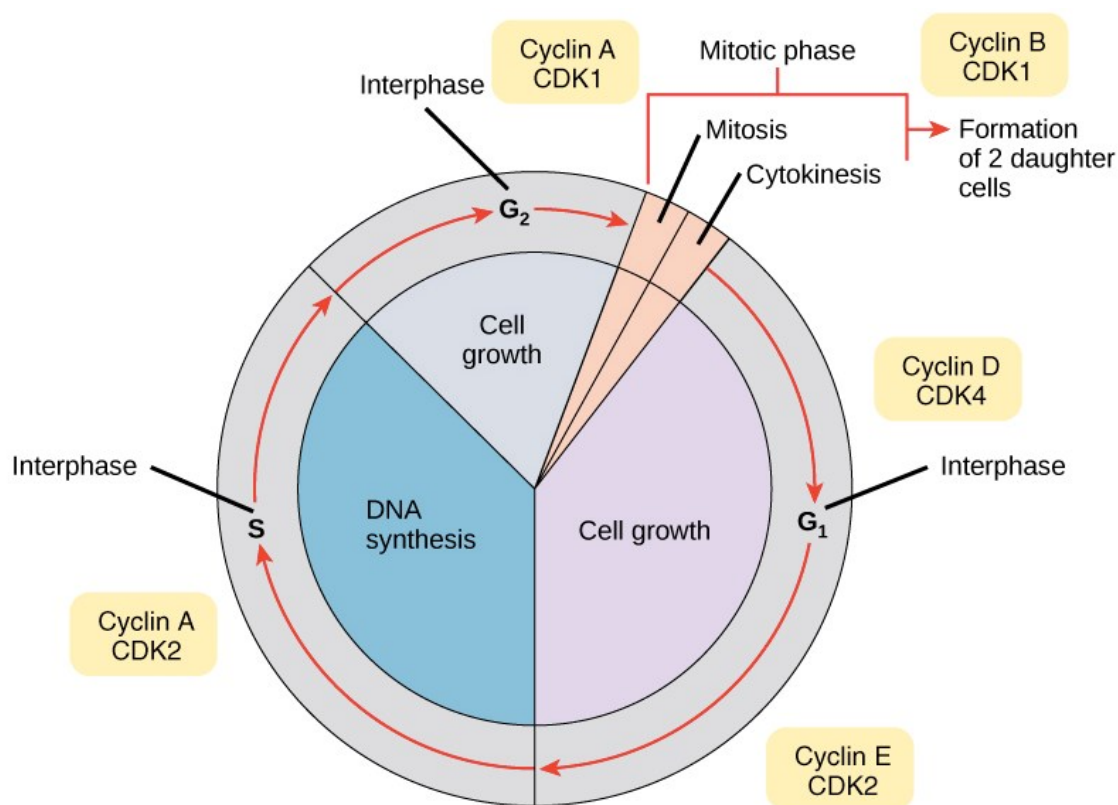
Jako buněčný cyklus se označuje soubor dějů odehrávajících se mezi dvěma buněčnými děleními (shrnutí v Schafer, 1998). Obvykle probíhá ve čtyřech fázích ( $G_1$ , S,  $G_2$ , M), které jsou pečlivě regulovány systémem cyklínů, cyklín-dependentních kináz (CDK) a inhibitorů cyklín-dependentních kináz (CKI). V  $G_1$  fázi dochází k růstu buňky, expresi genů, produkci proteinů a celkové přípravě na následující S fázi, kdy se během replikace duplikuje genetická informace.  $G_2$  fáze je opět fází přípravnou, buňka roste, syntetizuje další proteiny a kontroluje, zda v replikaci nedošlo k žádným chybám. V M fázi pak dojde k rozdělení genetické informace a celé buňky na dvě buňky dceřiné. Fáze  $G_1$ , S a  $G_2$  bývají také označovány společně jako interfáze. Během buněčného cyklu buňka prochází tzv. kontrolními body, kde může být pozastavena v případě, že se uvnitř nebo vně najdou chyby, které musí být před dalším postupem odstraněny.

### 2.1 Cyklin-dependentní protein kinázy

CDK jsou hlavní enzymy řídící buněčný cyklus skrze fosforylaci dalších regulačních proteinů. Ačkoliv jejich koncentrace zůstává v průběhu buněčného cyklu stejná, jejich aktivita se cyklicky mění. Děje se tak na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti jejich vlastních kontrolních proteinů, z nichž nejvýznamnější jsou cyklíny. Ty jsou na rozdíl od CDK přítomny pouze v určitých fázích buněčného cyklu. Konkrétní CDK je aktivovaná pouze tehdy, když má na sobě navázaný příslušný cyklín.

V lidských buňkách se regulace buněčného cyklu účastní především 4 různé CDK (CDK1, CDK2, CDK4 a CDK6) a 4 různé třídy cyklínů (CycA, CycB, CycD a CycE). V  $G_1$  fázi je v buňce přítomný CycD, který váže a tím aktivuje CDK4 a CDK6. Činnost tohoto komplexu následně vede k expresi CycE vázajícího CDK2. Aktivní komplex CDK2/CycE je klíčový pro přechod z  $G_1$  fáze do fáze S. CycE se v buňce vyskytuje pouze v časně S fázi, poté jeho hladina klesá a CDK2 tvoří komplex s CycA, který řídí přechod do  $G_2$  fáze. Na konci interfáze se tvoří komplex CDK1/CycA značící počátek mitózy, která je následně řízena komplexem CDK1/CycB. Zajímavostí je, že tento obecně přijímaný model buněčného cyklu, který spojuje každou fázi s příslušným komplexem CDK/Cyc, neplatí univerzálně pro všechny typy buněk. Naopak se ukázalo, že pro vývoj je nezbytná pouze CDK1, a že poškození ostatních CDK se vývojovými vadami projeví pouze ve specializovaných buněčných liniích (shrnutí v Malumbres and Barbacid, 2009).





Obrázek 1: Buněčný cyklus se skládá ze tří fází přípravných (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>), společně pojmenovaných jako interfáze, a vlastního buněčného dělení (M fáze). V každé fázi je typická aktivita určitého komplexu CDK/Cyc. (Zdroj: <https://www.khanacademy.org/science/biology/cellular-molecular-biology/mitosis/a/cell-cycle-phases>; upraveno podle [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0332\\_Cell\\_Cycle\\_With\\_Cyclins\\_and\\_Checkpoints.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0332_Cell_Cycle_With_Cyclins_and_Checkpoints.jpg))

Funkce komplexů CDK/Cyc je dále modulována pomocí CKI. Ty jsou součástí dvou proteinových rodin: INK4 (inhibitors of CDK4) proteiny zahrnují p15, p16, p18 a p19; a CIP/KIP (CDK interacting protein/kinase inhibitory protein) proteinová rodina obsahuje p21, p27 a p57. CKI mají v buněčném cyklu opačnou roli oproti cyklinům, jejich úkolem je tedy pozastavit průběh buněčného cyklu a zabránit tak proliferaci buněk (shrnutí v Malumbres and Barbacid, 2009).

K velmi důležitým regulačním proteinům, které je potřeba alespoň zmínit, patří kináza WEE1 (small cell protein) a fosfatáza CDC25 (cell division cycle 25). Ty působí na úrovni M fáze, změnou aktivity komplexu CDK1/CycB. Pokud je CDK1 fosforylována enzymem WEE1, je komplex neaktivní, defosforylace pomocí CDC25 jej naopak aktivuje a vede ke spuštění mitózy (shrnutí v Crnec, 2019).

## 2.2 Proliferace kmenových buněk

Důležitým objektem zkoumání buněčné proliferace jsou kmenové buňky, které si během života zachovávají schopnost dělení, „sebeobnovy“ a diferenciace. Studium pluripotentních kmenových buněk bylo např. potvrzeno, že pro určení osudu dělicí se buňky je klíčová fáze G<sub>1</sub>. V této fázi buňka shromažďuje všechny mitogenní signály přicházející zevnitř i z jejího okolí a převádí je do buněčného cyklu aktivací CDK (shrnutí v Dalton and Coverdell, 2016).

Signálními drahami, které řídí dělení kmenových buněk, se věnují mimo jiné studie zabývající se nádorovými onemocněními. Právě tkáň, podléhající neustálé obnově ze zdrojů kmenových buněk jsou totiž ty, ve kterých nejčastěji dochází k rozvoji nádorového bujení. Z tohoto hlediska jsou nejdůležitější dráhy Hedgehog a Wnt, které také sdílí řadu společných mechanismů (shrnutí v Massagué, 2004). V dalších kapitolách se zaměříme pouze na jednu z nich, a tou je signalizace vedoucí přes Wnt/ $\beta$ -katenin.

### 3 Wnt signalizace

Wnt (Wingless/Int-1) signalizační dráha hraje důležitou roli v proliferaci a diferenciaci kmenových buněk, a to jak v embryonálním vývoji, tak při obnově tkání dospělých jedinců (Kioussi *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2010). Jedná se o velmi konzervovanou kaskádu signální transdukce, která je aktivována pomocí sekretovaných proteinů WNT.

Prvním popsaným genem této signalizační kaskády byl gen *wingless* u *Drosophila melanogaster*, jehož význam spočívá v určování polarity tělních segmentů během larválního vývoje (Sharma, 1973; Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Později, v roce 1982, byl díky výzkumu virově vyvolaných nádorů prsní žlázy, objeven jeho homolog, gen *Int-1*, u myši (Nusse and Varmus, 1982). To, že se jedná o vysoce konzervovanou signální dráhu, jak u bezobratlých, tak u obratlovců, potvrdily také pokusy s *Xenopus laevis*. Do oplodněných vajíček byla aplikována mRNA myšního genu *Wnt1* (původně označeného jako *Int1*), což způsobilo duplikaci tělní osy a tím prokázalo, že alespoň část dráhy je u těchto organismů totožná (McMahon and Moon, 1989).

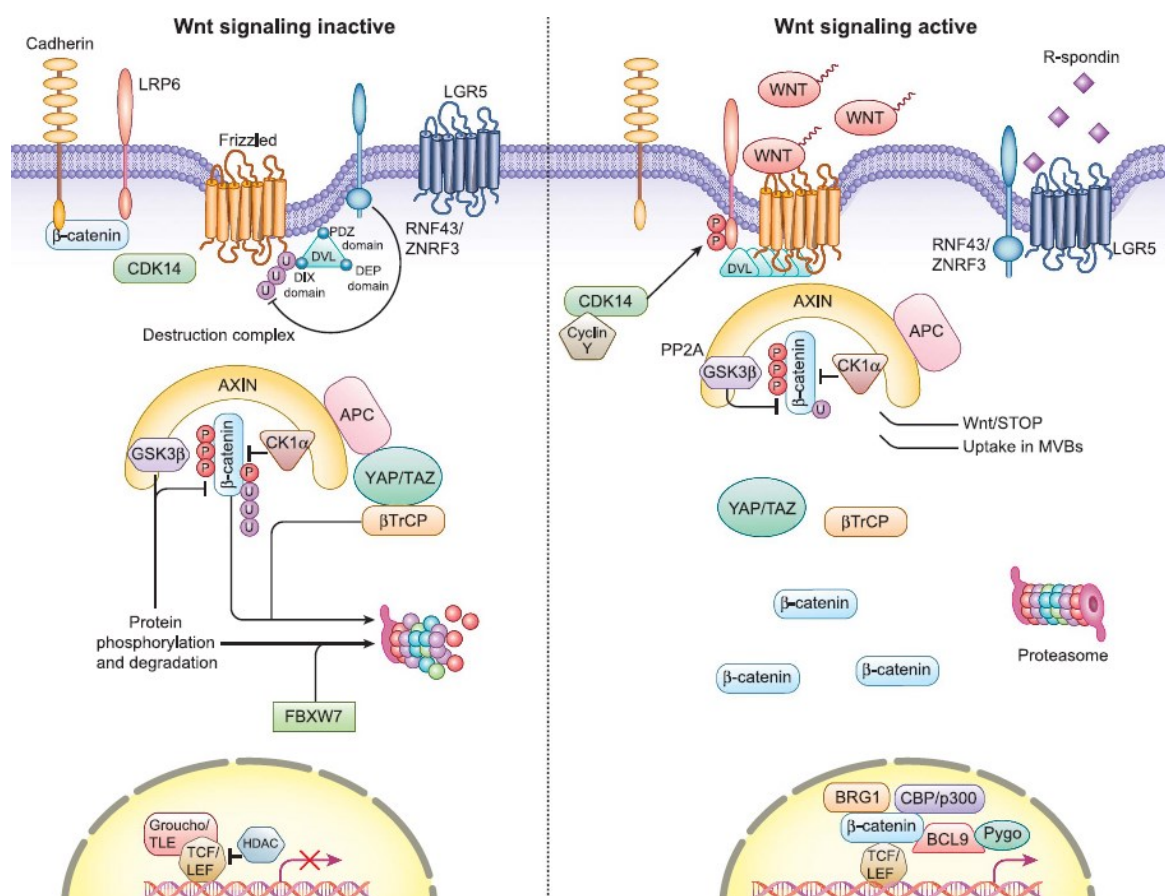
Když se protein WNT naváže na receptor v membráně buňky, může tím aktivovat jednu ze tří v současnosti popsaných kaskád: kanonickou Wnt/ $\beta$ -katenin nebo nekanonickou Wnt/PCP (planar cell polarity) a Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  signalizaci. Z nich nejlépe popsanou je kanonická dráha závislá na  $\beta$ -kateninu.

#### 3.1 Kanonická dráha Wnt/ $\beta$ -katenin

Lipoglykoproteiny WNT jsou signální molekuly sekretované do okolí buňky, kde působí jako lokální mediátory a morfogeny. V kanonické dráze se jejich signál přenáší přes cytoplazmatický transkripční faktor  $\beta$ -katenin. Ten je v nepřítomnosti Wnt proteinů fosforylován kinázami destrukčního komplexu, tvořeného proteiny AXIN, APC (adenomatous polyposis coli), CK1 $\alpha$  (casein kinase 1 $\alpha$ ) a GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ). Fosforylace  $\beta$ -kateninu vede k jeho ubiquitinaci proteinem  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase) a následné degradaci v proteasomu (Aberle *et al.*, 1997). V jádře je přepis cílových genů umlčen inhibičním komplexem proteinů LEF/TCF/Groucho/TLE (lymphoid enhancer binding factor/T-cell transcription factor/groucho/transducin-like enhancer of split).

Když se u vnější strany cytoplazmatické membrány cílových buněk objeví protein WNT, interaguje s extracelulární N-terminální na cystein bohatou doménou (CRD) receptoru Frizzled (FZD). FZD je povrchový sedmkrát přes membránu procházející protein, který při vazbě svého ligandu a přenosu signálu vyžaduje spolupráci transmembránového

koreceptoru LRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6). Vazba WNT na FZD vede k nahromadění proteinu Dishevelled (DVL) u plazmatické membrány, kde je DVL interakcí s FZD aktivován, tvoří polymery (Schwarz-Romond *et al.*, 2007; Gammons *et al.*, 2016) a napomáhá fosforylaci koreceptoru LRP (Bilić *et al.*, 2007). DIX domény, přes které polymerizují proteiny DVL, se nachází také na proteinu AXIN destrukčního komplexu. AXIN se tak váže na polymery DVL (Yamanishi *et al.*, 2019) a dostává se do blízkosti fosforylovaného LRP, který přímou vazbou na GSK3 $\beta$  blokuje její katalytickou aktivitu (Stamos *et al.*, 2014). Díky tomu je  $\beta$ -katenin uvolněn z destrukčního komplexu a stabilizován v cytoplazmě.  $\beta$ -katenin poté vstupuje do jádra, kde interaguje s komplexem DNA-vazebných proteinů TCF/LEF, tím způsobí vyvázání represorů Groucho/TLE a spouští tak transkripci cílových genů (Daniels and Weis, 2005). Výsledné změny hodně záleží na tom, v jakém druhu buňky ke spuštění Wnt signální kaskády došlo, protože většina genů ovlivňovaných touto dráhou je zřejmě specifická pro konkrétní buněčný typ (shrnutí v Clevers, 2006).



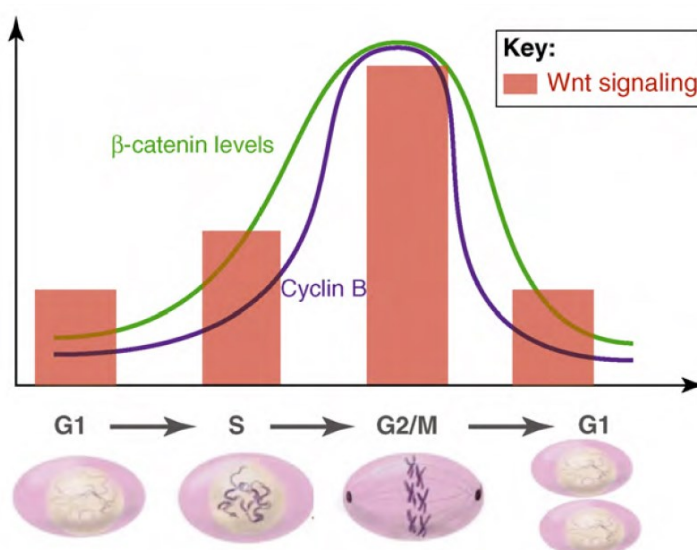
Obrázek 2: Kanonická signalizace Wnt/ $\beta$ -katenin. V nepřítomnosti WNT ligandu je  $\beta$ -katenin vázán proteiny destrukčního komplexu a po fosforylaci degradován v proteasomu. Po navázání WNT na receptor FZD dochází k uvolnění  $\beta$ -kateninu a jeho translokaci do jádra, kde následně spouští transkripci cílových genů. (Zdroj: Zhan, Rindtorff and Boutros, 2017)

### 3.2 Cílové geny signalizace Wnt/ $\beta$ -katenin

Je známo mnoho cílových genů komplexu  $\beta$ -katenin/TCF/LEF, avšak mezi nejvíce studované patří geny pro c-Myc (avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog) a CycD1. Tyto geny jsou známy tím, že mohou být zapojeny v procesech vzniku a rozvoje nádorových onemocnění, a pochopení jejich funkce a regulace má tedy potenciál pro využití v medicíně (shrnutí v Clevers, 2006; Lecarpentier *et al.*, 2019).

### 3.3 Wnt dráha a buněčný cyklus

Existuje velké množství studií dokazujících souvislost mezi signalizací Wnt/ $\beta$ -katenin a buněčným cyklem. Hladina  $\beta$ -kateninu v průběhu cyklu osciluje a nejvyšší úroveň dosahuje během přechodu G<sub>2</sub>/M. Důležitým faktorem ovlivňujícím Wnt signalizaci je mitotický komplex CDK14/CycY, který napomáhá fosforylaci koreceptoru LRP6. Dalším příkladem, kdy naopak Wnt signalizace působí na buněčný cyklus, může být již výše zmíněný efekt na expresi CycD. Stimulační signály způsobí vzrůst koncentrace CycD a ten v komplexu s CDK4/6 fosforyluje pRb (retinoblastoma protein). Protein Rb vázal a tím inaktivoval transkripční faktory z rodiny E2F (early 2 factor). Touto fosforylací však došlo k jejich uvolnění a E2F-závislé transkripci genů. Mezi E2F-závislé geny patří také gen pro CycE, jehož expresí je aktivována CDK2 a je tedy zahájen vstup do S fáze. Kromě těchto interakcí jsou některé komponenty Wnt dráhy včetně  $\beta$ -kateninu důležitou součástí centrozomů nebo kinetochorů a mají tedy také význam při regulaci aparátu mitotického dělicího vřeténka. Narušení některé z těchto komponent je znakem často nacházeným v rakovinných buňkách (shrnutí v Davidson and Niehrs, 2010).



Obrázek 3: Aktivita Wnt signalizace se v průběhu buněčného cyklu mění. Hladina  $\beta$ -kateninu je nejvyšší v době přechodu z G<sub>2</sub> do M fáze. (Zdroj: Davidson and Niehrs, 2010)

## 4 Cirkadiánní hodiny

Většina organismů obývajících Zemi žije v prostředí s periodicky se opakujícími vnějšími podmínkami. Díky tomu v evoluci došlo k vývoji specifických fyziologických systémů, které jim pomáhají tyto podmínky předvídat a lépe se tak na ně adaptovat. Nejdůležitějším cyklem je střídání dne a noci. Mechanismus, kterým se mu organismy přizpůsobují, je založen na tzv. biologických cirkadiánních hodinách. Hodiny sídlí téměř ve všech buňkách těla a jejich úkolem je seřizovat množství fyziologických pochodů tak, aby běžely s periodou 24 hodin a kopírovaly tak tento denní cyklus. Cirkadiánní rytmus se vytváří na molekulární úrovni prostřednictvím tzv. hodinových genů a jejich proteinových produktů, a je autonomně udržován pomocí transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček (shrnutí v Lowrey and Takahashi, 2011). U savců se systém hodin skládá z části centrální, uložené v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (Ralph *et al.*, 1990), a z částí periferních, v nichž je rytmická genová exprese dlouhodobě udržována a seřizována na stejnou fázi díky signálům přicházejícím z centrálních hodin (shrnutí v Schibler, Ripperger and Brown, 2003). Centrální hodiny v suprachiasmatických jádrech mohou ze sítnice přijímat informace o vnějším osvětlení a seřizovat se tak v souladu s okolními podmínkami (shrnutí v Rea, 1998).

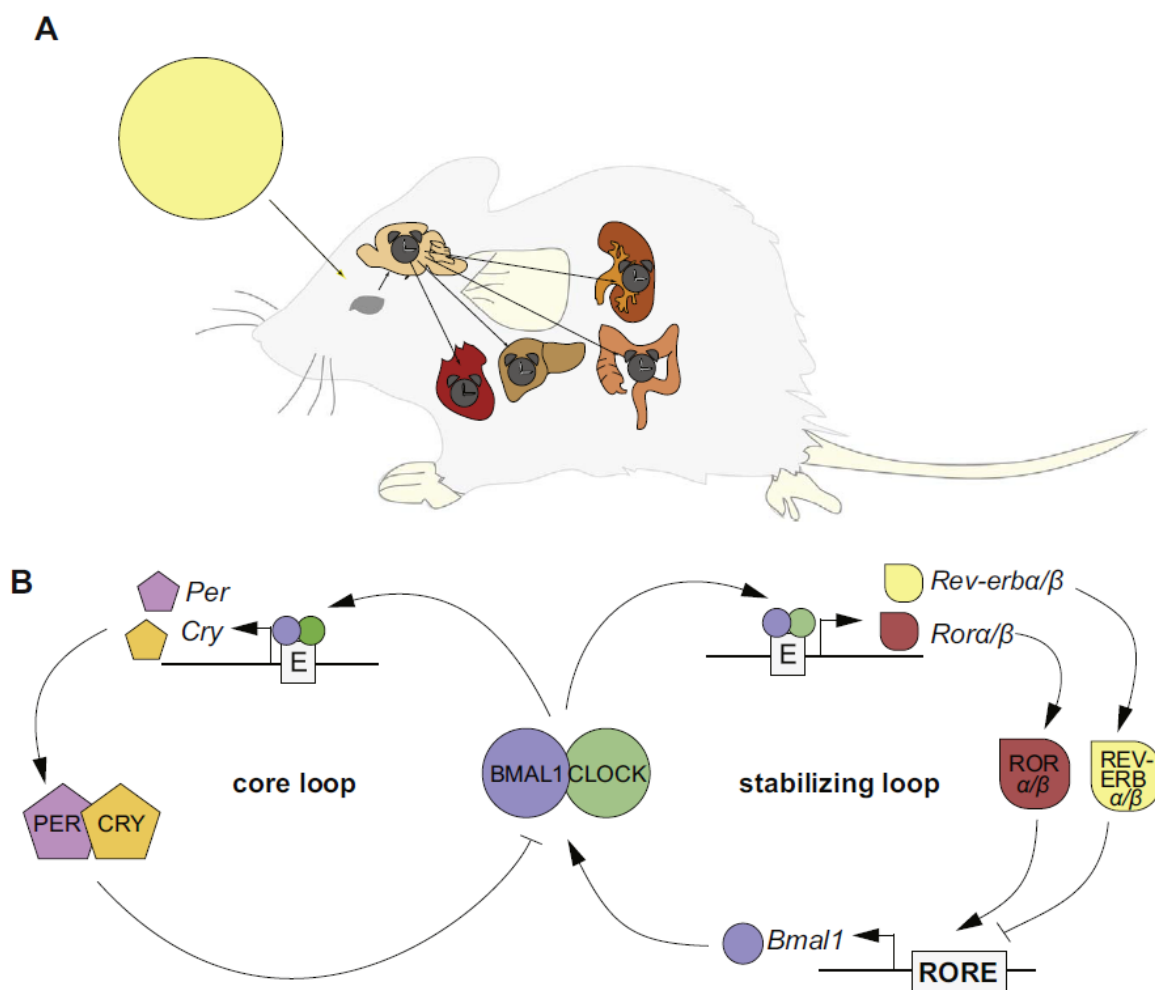
### 4.1 Molekulární mechanismus hodin

Jak již bylo zmíněno výše, ústřední pozici v tvorbě cirkadiánních rytmů mají tzv. hodinové geny. Významným milníkem ve výzkumu genetické podstaty hodin savců bylo popsání prvních dvou důležitých genů, *Clock* (circadian locomotor output cycles kaput; Antoch *et al.*, 1997; King *et al.*, 1997) a *Per1* (period; Sun *et al.*, 1997), u myši. Dnes se mezi hodinové geny řadí také *Bmal1* (brain and muscle aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1), *Per2*, *Per3*, *Cry1* (cryptochrome 1), *Cry2*, *Rev-erba*, *Rora* (retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$ ) a *Csnk1d/e* (casein kinase 1 $\delta/\epsilon$ ). Jejich cyklická exprese je regulována systémem pozitivních a negativních zpětnovazebných smyček a udržuje se tak zcela autonomně v rámci jednotlivých buněk (shrnutí v Lowrey and Takahashi, 2011).

V době subjektivního dne se tvoří dimery CLOCK/BMAL1, které vstupují do jádra a působí zde jako transkripční faktory hodinami řízených genů. Spouští mimo jiné i přepis genů *Per* a *Cry*, jejichž proteinové produkty se během dne hromadí a pak opět jako heterodimery vstupují do jádra, kde plní funkci inhibitorů CLOCK/BMAL1. Zabrání tak tedy i přepisu své vlastní mRNA. Během subjektivní noci jsou dimery PER/CRY

odbourány a tak může znovu začít transkripce pomocí CLOCK/BMAL1 (shrnutí v Takahashi *et al.*, 2008).

Tato hlavní hodinová smyčka je navíc doplněna dvěma jadernými receptory, REV-ERB $\alpha$  a ROR $\alpha$ , jejichž exprese je spouštěna komplexem CLOCK/BMAL1. REV-ERB $\alpha$  pak zpětně inhibuje expresi genu *Bmal1*, zatímco ROR $\alpha$  působí na přepis tohoto genu pozitivně (Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004).



Obrázek 4: Cirkadiánní hodiny savců sestávají z části centrální a periferní. Centrální hodiny v suprachiasmatických jádrech hypotalamu přijímají informace ze sítnice a pak seřizují jak sebe, tak také periferní oscilátory s ohledem na vnější světelné podmínky (A). Na molekulární úrovni je mechanismus hodin řízen pomocí pozitivních a negativních transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček. Pro udržování rytmicity je klíčový dimer CLOCK/BMAL1, který funguje jako transkripční faktor a přepisuje geny *Per* a *Cry*. Dimer PER/CRY pak po vstupu do jádra svůj transkripční faktor zpětně inhibuje (B). (Zdroj: Weger *et al.*, 2017)

## 4.2 Hodinami řízené geny

Cirkadiánní hodiny běží autonomně s periodou ~24 hodin a mají za úkol seřizovat i další buněčné procesy tak, aby byly v souladu s denní dobou. Způsob, jakým signál předávají dále, je skrz regulaci transkripce cílových genů. Hodinové proteiny se mohou vázat na dva druhy promotorových sekvencí. Jednou z nich je sekvence zvaná E-box. Transkripce genu, který ve svém promotoru tuto sekvenci obsahuje, je spouštěna nasednutím heterodimeru CLOCK/BMAL1. K tomuto E-boxem zprostředkovanému přepisu tedy dochází během subjektivního dne, protože právě to je doba, kdy je aktivní komplex CLOCK/BMAL1 přítomný v jádře. Analýzou genomu v myších játrech bylo identifikováno přes 2 tisíce DNA-vazebných míst pro BMAL1, z nichž 60 % je aktivováno rytmicky (Rey *et al.*, 2011). Druhou sekvencí, přes kterou hodiny řídí přepis genů, je sekvence RORE (ROR response element), rozeznávaná proteiny REV-ERB a ROR. Ty jsou sami pod kontrolou komplexu CLOCK/BMAL1. Transkripční aktivita REV-ERB může vést k dalšímu zesílení rytmu, primárně vytvořených tímto komplexem. Příkladem může být protein p21, který je nepřímo inhibován aktivitou proteinů CLOCK/BMAL1 a zároveň má ve svém promotoru RORE sekvenci. Pokud se na ni naváže REV-ERB, brání tedy navíc transkripci jeho genu (Gréchez-Cassiau *et al.*, 2008).

V jednotlivých savcích tkáních vykazuje cirkadiánní expresi přibližně 10 % aktivně přepisovaných genů (shrnuje Masri and Sassone-Corsi, 2010). Ačkoliv většina z nich je rytmická právě v jednom typu tkáně, mnoho z těchto hodinově řízených genů kóduje proteiny účastnící se regulace buněčného cyklu, které bývají méně tkáňově specifické.

## 4.3 Cirkadiánní hodiny a buněčný cyklus

Jak u organismů prokaryotického typu, tak u eukaryot bylo pozorováno, že určité fáze buněčného cyklu bývají obvykle spjaty s konkrétní denní dobou. V evoluci, schopnost takto omezit dělení buněk, zřejmě znamenala selekční výhodu (Scheving *et al.*, 1978; Woelfle *et al.*, 2004). U savců k fázím S a M buněčného cyklu obvykle dochází v době subjektivního dne. U člověka je nejvíce buněk v S fázi kolem třetí hodiny odpoledne, zatímco u myši S fáze dominuje kolem třetí hodiny ráno, což u obou zcela koreluje s částí dne, ve které jsou aktivní (shrnuje Brown, 1991).

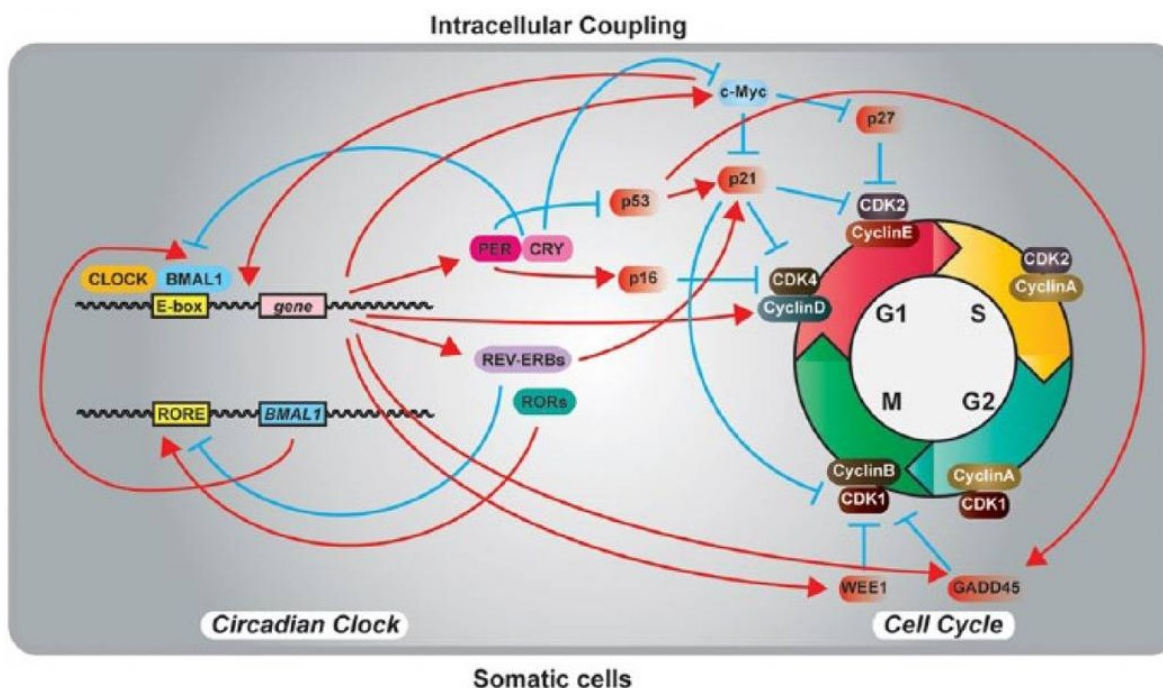
Cirkadiánní hodiny a buněčný cyklus spolu interagují na molekulární úrovni. Hodinový mechanismus řídí cyklickou expresi genů, z nichž se mnoho účastní regulace buněčného dělení. Proteiny buněčného cyklu mohou naopak zase ovlivňovat chod hodin. Za



fyziologického stavu jsou tyto cyklické systémy ve vzájemné souhře, ale narušení jednoho může mít negativní dopad i na jeho spoluhráče.

Důležitým objektem, při studiu jejich vzájemného působení, jsou kmenové buňky dospělého organismu. Ty jsou totiž hlavními dělicími se buňkami našeho těla a jsou také pod kontrolou hodin. V embryonálních kmenových buňkách cirkadiánní rytmus ještě není vyvinut, ale je indukován až během jejich diferenciace (Yagita *et al.*, 2010).

Mezi nejdůležitější proteiny buněčného cyklu, jejichž koncentrace se v buňce cyklicky mění, patří některé cykliny (CycD1/D2, CycA1/A2, CycE a další), CKI (p21, p27, p57), regulační proteiny jako WEE1 a GADD45 $\alpha/\beta$  (growth arrest and DNA damage 45  $\alpha/\beta$ ), nebo proteiny Wnt/ $\beta$ -katenin, MAPK (mitogen-activated protein kinase) a dalších signálních drah. Ne všechny geny, jejichž exprese je rytmická, jsou pod přímou transkripční kontrolou hodin. Mnohé z nich nemají v promotoru ani E-box ani RORE, ale jejich aktivita je regulována jiným, hodinově řízeným proteinem (shrnutí v Soták, Sumová and Pácha, 2014).

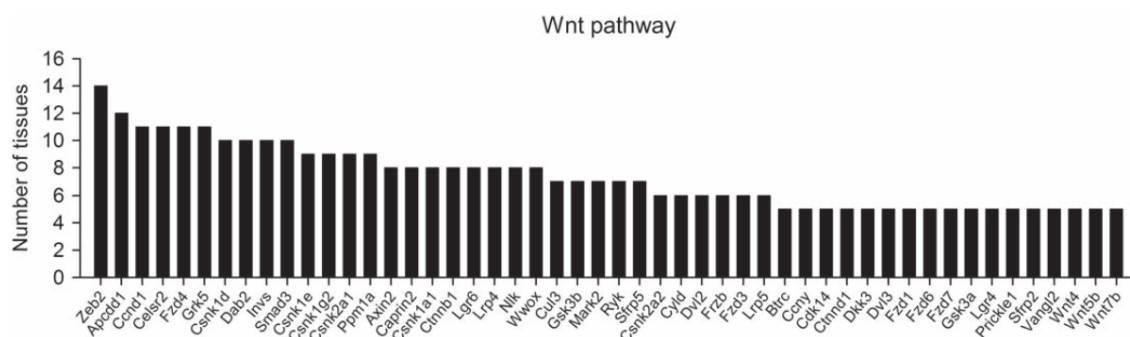


Obrázek 5: Intracelulární propojení cirkadiánních hodin a buněčného cyklu (shrnutí v Shostak, 2017; Chan, Huber and Lamia, 2020). Hodiny jsou schopné modulovat buněčný cyklus na úrovni G<sub>1</sub>/S a G<sub>2</sub>/M přechodu. Expres p53 je podporována transkripčním faktorem BMAL1 a jeho stabilitu reguluje PER2. Cyklická exprese p16 je podporována proteinem PER. Další z CKI p21 je regulován pomocí REV-ERB. CRY2 zase napomáhá degradaci c-Myc a reguluje transkripční faktory z rodiny E2F. Kináza WEE1 je pod přímou kontrolou hodinových proteinů CLOCK/BMAL1. Kromě těchto a dalších interakcí, se cirkadiánní hodiny účastní také odpovědi na poškození DNA. (Zdroj: Matsuura, Moore and Hong, 2018)

## 5 Wnt/ $\beta$ -katenin signalizace jako prostředník mezi hodinami a buněčným cyklem

Kromě přímých vlivů v rámci buňky, je buněčný cyklus řízen také vnějšími signály přicházejícími z okolní tkáně, které se přenášejí přes příslušné receptory a signální kaskády. Některé geny těchto signálních drah mají ve svém promotoru E-box, reagující na přítomnost komplexu CLOCK/BMAL1. Cirkadiánní hodiny tak mohou buněčnou proliferaci synchronizovat také nepřímo, prostřednictvím sekrece extracelulárních signálních molekul. Signalizace přes proteiny WNT je toho dobrým příkladem (Guo *et al.*, 2012).

Mnoho proteinů účastnících se Wnt signalizace přímo, nebo aspoň její regulace, vykazuje rytmickou expresi. Rytmicky jsou exprimovány např. geny pro některé proteiny WNT (*Wnt3a*, *Wnt4*, *Wnt5b*, *Wnt7b*, *Wnt10a*), receptory FZD (*Fzd1*, *Fzd3*, *Fzd4*, *Fzd6*, *Fzd7*), protein AXIN (*Axin2*), proteiny DVL (*Dvl1*, *Dvl2*), kadherinový receptor (*Celsr2*), kinázy GSK3 (*Gsk3a*, *Gsk3b*), kasein kinázy (*Csnk1a1*, *Csnk1d*, *Csnk1e*, *Csnk1g2*, *Csnk2a1*, *Csnk2a2*), cykliny (*Ccnd1*, *Ccny*), CDK14 (*Cdk14*), kateniny (*Ctnnb1*, *Ctnnd1*), koreceptory LRP (*Lrp4*, *Lrp5*), dále geny *Apcdd1*, *Ryk*, *Lgr4*, *Lgr6* a další (shrnuto v Soták, Sumová and Pácha, 2014).



Obrázek 6: Graf ukazuje některé důležité geny spojené s Wnt signalizací, které jsou exprimovány rytmicky alespoň v pěti typech tkání. (Zdroj: Soták, Sumová and Pácha, 2014)

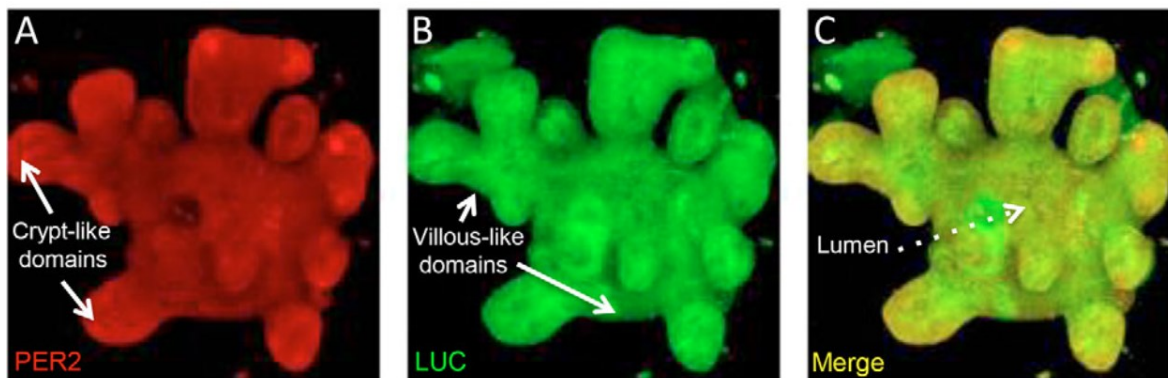
Vzhledem k tomu, že je působení Wnt signalizační kaskády tkánově specifické, detailnější popis interakcí mezi cirkadiánními hodinami a buněčným cyklem je dále rozdělen podle jednotlivých tkání, ve kterých byla tato interakce zkoumána.

## 5.1 Epitel tenkého střeva

Střevní epitel je nejrychleji se obnovující tkáň u savců. U myši trvá jeho obnovení asi 3 až 5 dní. Povrchová vrstva tenkého střeva je uspořádána do klků a krypt. Klky vybíhají směrem do lumen a zvětšují absorpční povrch střeva, zatímco krypty směřují od báze klků dolů do slizničního vaziva. Na dně každé krypty sídlí 4 až 6 kmenových buněk. Ty se dělí a tvoří tak buňky progenitorové, které se posouvají kryptou směrem vzhůru a následně diferencují na jeden z typů střevních buněk (to jsou především enterocyty, pohárkové buňky, Panethovy buňky a enteroendokrinní buňky). Posun buněk pokračuje i v jejich diferencovaném stavu a končí až na špičkách klků, kde dochází k jejich odumírání a odlučování. Výjimkou jsou Panethovy buňky, k jejichž diferenciaci dochází na dně krypty, kde pak zůstávají spolu s buňkami kmenovými. Kmenové buňky dostávají z Panethových buněk signály, např. v podobě sekrece proteinů WNT, ale i dalších růstových faktorů udržujících jejich homeostázu (Sato *et al.*, 2011).

Endogenní cirkadiánní hodiny jsou přítomny jak v tenkém, tak v tlustém střevě (Froy and Chapnik, 2007; Hoogerwerf *et al.*, 2007; Sládek *et al.*, 2007). Pomáhají seřizovat fyziologické děje odehrávající se v gastrointestinálním traktu, jako např. motilitu střev, vstřebávání živin nebo buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptózu (shrnuto v Scheving, 2000; Bjarnason and Jordan, 2002). Exprese hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* i hodinami řízených genů, jako je např. *Weel*, je v jednotlivých částech gastrointestinálního traktu synchronizována. Hladina jejich exprese ve dvanáctníku tenkého střeva a v tlustém střevě se však ve stejném časovém okamžiku liší. Kaudální části střeva jsou oproti kraniálním fázově opožděny. Zdá se tedy, že cirkadiánní hodiny mohou ovlivňovat časování buněčného cyklu autonomně v jednotlivých částech střeva (Polidarová *et al.*, 2009).

Ke studiu tohoto mnohobuněčného systému se dnes s výhodou využívají především střevní organoidy (enteroidy), které se mohou tvořit z jednotlivých krypt nebo dokonce dělením jediné *Lgr5*<sup>+</sup> kmenové buňky. *Lgr5* (leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5) je jeden z cílových genů Wnt signalizace, jehož exprese je typická právě pro kmenové buňky, a to jak v tenkém, tak v tlustém střevě (Barker *et al.*, 2007). Enteroidy se sami uspořádají tak, že vytvoří 3D strukturu připomínající skutečnou střevní tkáň. Krypty vyčnívají z povrchu organoidu, jeho „tělo“ je tvořeno diferencovanými buňkami klků a uvnitř je doména napodobující lumen střeva (Sato *et al.*, 2009).



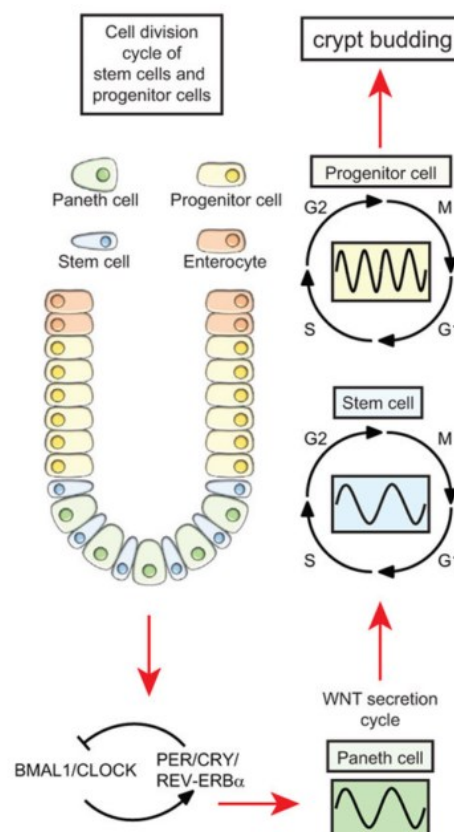
Obrázek 7: Enteroidy napodobují prostorové uspořádání střevní tkáně. Jsou tvořeny doménami připomínajícími lumen střeva, klky a krypty. Na dně krypt je možné vidět Panethovy buňky. (Zdroj: Moore *et al.*, 2014)

Organoidy – připravené z tenkého střeva PER2::LUC myši – vykazují robustní cirkadiánní rytmy po dobu minimálně 4 dní. Přitom se hodiny jednotlivých buněk organoidu zcela autonomně synchronizují. Je také zajímavé, že pokud je v jedné kultuře přítomno více organoidů, pak se časem synchronizuje tato celá skupina. To všechno naznačuje tomu, že je střevní epitel sídlem autonomních periferních hodin (Moore *et al.*, 2014).

V dalších pokusech s organoidy se testovalo, zda jsou tyto periferní hodiny schopné ovlivnit dělení buněk střevního epitelu. Ukázalo se, že nejen hodiny, ale i buněčný cyklus je v jednotlivých organoidech i v populaci spolu kultivovaných organoidů synchronizovaný. Oproti hodinám s periodou ~24 hodin, je však perioda rytmického buněčného dělení asi poloviční. To, že jsou hodiny skutečně nezbytné pro synchronizaci buněčné proliferace, bylo potvrzeno pokusem, ve kterém byla utlumena exprese genu *Bmal1*. Došlo tím samozřejmě ke snížení amplitudy rytmu PER2. Výrazné snížení amplitudy bylo ale zaznamenáno i v periodě buněčného cyklu (Matsu-ura *et al.*, 2016). Ta samá studie se dále zabývala simulací různých mechanismů, které by mohly vysvětlovat hodinově zprostředkovanou synchronizaci buněčných cyklů. Dospěla k závěru, že se tak děje skrz signalizaci WNT proteiny, které v cílových buňkách umožní přechod z G<sub>1</sub> do S fáze. Některé geny Wnt signalizace jsou v enteroidech přepisovány rytmicky, a pokud je utlumen gen *Bmal1*, jejich oscilace mizí, což dokazuje vliv hodin na tuto dráhu. Proteiny WNT jsou ve střevním epitelu produkovány Panethovými buňkami lokalizovanými na dně krypt. Když byly tyto buňky odstraněny, byla narušena také synchronizace buněčného dělení. Rovněž zajímavé je, že v Panethových buňkách byly detekovány cirkadiánní rytmy, zatímco v buňkách kmenových a progenitorových jsou rytmy pouze slabé, s nízkou amplitudou. To také vede k závěru, že právě Panethovy buňky jsou těmi lokálními

periferními hodinami, které sekrecí proteinů WNT synchronizují dělení kmenových buněk tenkého střeva (Matsu-ura *et al.*, 2016).

Obrázek 8: Cirkadiální hodiny regulují sekreci WNT z Panethových buněk a synchronizují tak dělení buněk kmenových a progenitorových. (Zdroj: Matsu-ura *et al.*, 2016)



## 5.2 Tuková tkáň

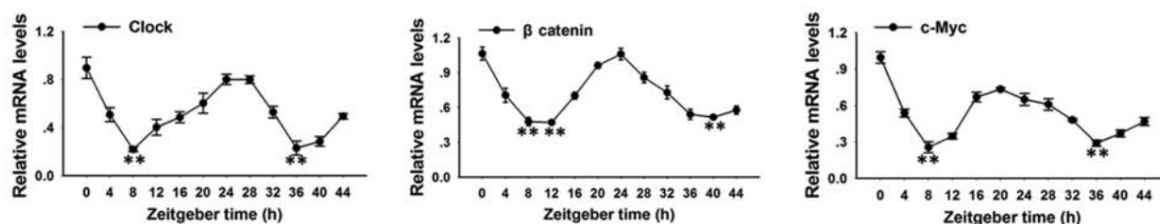
Buňky tukové tkáně (adipocyty) ukládají v těle energii ve formě lipidů. Vyvíjejí se v procesu adipogeneze z mezenchymálních kmenových buněk, schopných dát, kromě tkáně tukové, vznik také tkáni kostní, svalové a pojivové (shrnuje Gesta, Tseng and Kahn, 2007). Bylo dokázáno, že diferenciace adipocytů je inhibována Wnt signální dráhou. Wnt signalizace brání expresi transkripčních faktorů C/EBP $\alpha$  (CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ ) a PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ), které jsou pro jejich vývoj z preadipocytů nezbytné (Wang *et al.*, 1995; Rosen *et al.*, 1999). Zvýšená aktivace kanonické Wnt dráhy vede k snížení množství adipocytů a tedy i úbytku hmoty tukové tkáně u myši (Longo *et al.*, 2004). Pokud je naopak Wnt signalizace inhibována, dochází k adipogenezi i v nepřítomnosti indukujícího signálu (Ross *et al.*, 2000). Mutace v genu *Wnt10b* byla také spojena s lidskou obezitou raného věku (Christodoulides *et al.*, 2006).

Jak v preadipocytech, tak v adipocytech, běží endogenní cirkadiální hodiny a zprostředkovávají rytmickou expresi některých genů (Otway, Frost and Johnston, 2009). Myš, která je homozygotní v mutaci genu *Clock*, vykazuje změny v rytmickém příjmu potravy, má narušenou regulaci tělesné hmotnosti a je u ní velmi pravděpodobný rozvoj obezity (Turek *et al.*, 2005).

V roce 2012 byla vydána studie, která ukazuje, že přímá spojitost mezi narušením cirkadiálních rytmtů a obezitou vede přes kanonickou Wnt signalizaci (Guo *et al.*, 2012). Autoři popisují, že u myši se ztrátou genu *Bmal1* došlo k nárůstu tukové tkáně až na dvojnásobek oproti kontrolám a byla detekována vyšší hladina exprese faktorů indukujících adipogenezi, včetně C/EBP $\alpha$  a PPAR $\gamma$ . Stejného efektu bylo dosaženo, když

byla exprese *Bmal1* utlumena pomocí shRNA. Kromě zvýšené adipogeneze, zároveň poklesla hladina proteinů účastnících se Wnt signální kaskády: WNT10A, FZD5, DVL2, TCF3, AXIN2 a  $\beta$ -katenin. Naopak, pokud byla exprese *Bmal1* zvýšena, vzrostla i aktivita Wnt signalizace. Mimo jiné bylo také potvrzeno, že geny pro WNT10A, DVL2,  $\beta$ -katenin a TCF3 jsou pod přímou transkripční kontrolou BMAL1 (Guo *et al.*, 2012).

Později se jiná studie zabývala také rolí genu *Clock* v adipogenezi a potvrdila předchozí výsledky, jelikož CLOCK a BMAL1 fungují společně jako heterodimery (Zhu *et al.*, 2016). Pokud byl v preadipocytech inhibován *Clock*, došlo k oslabení exprese genů Wnt signalizace. Když byla naopak hladina CLOCK zvýšena, vzrostla také exprese genů Wnt dráhy a hladina  $\beta$ -kateninu v buňkách. Po aplikaci sérového šoku byl detekován rytmus nejen v expresi genu *Clock*, ale i v genech pro  $\beta$ -katenin a c-Myc, což dále potvrzuje, že hodiny skutečně regulují geny Wnt signální kaskády. Inhibice genu *Clock* se projevila zvýšením hladiny transkripčních faktorů časně adipogeneze, opuštěním buněčného cyklu a diferenciací preadipocytů (Zhu *et al.*, 2016).



Obrázek 9: Cirkadiánní exprese genů *Clock*,  $\beta$ -katenin a *c-Myc* v buňkách preadipocytů po aplikaci sérového šoku. (Zdroj: Zhu *et al.*, 2016)

Také gen *Cry1* byl použit pro studium diferenciaci adipocytů. Když je u prekurzorových buněk stimulována adipogeneze, narůstá hladina CRY1, roste také hladina transkripčních faktorů C/EBP $\alpha$  a PPAR $\gamma$ , a přibývá množství tukových kapének. Snížení exprese *Cry1* vede k aktivaci kanonické Wnt signální kaskády, zvýšené hladině  $\beta$ -kateninu a poklesu hladiny inhibiční kinázy GSK3 $\beta$ . Je tedy zastavena i adipogeneze (Sun *et al.*, 2018). I to je opět v souladu s předchozími tvrzeními. Protein CRY1 totiž v hodinovém mechanismu tvoří negativní zpětnou smyčku a inhibuje funkci heterodimeru CLOCK/BMAL1. Pokud tedy dojde k utlumení exprese *Cry1*, aktivita CLOCK/BMAL1 je vysoká a vzrůstá s ní i aktivace Wnt signalizace, což brání diferenciaci preadipocytů.

Nejen diferenciaci, ale také proliferaci a apoptózu prekurzorových buněk, je ovlivňována hodinovými geny. Proliferace preadipocytů je např. podporována aktivitou hodinového genu *Clock*, vedoucí přes aktivaci Wnt signální dráhy k stimulaci přechodu G<sub>1</sub>/S. Snížená exprese genu *Clock* se projeví menší dělivostí buněk, zatímco zvýšení jeho



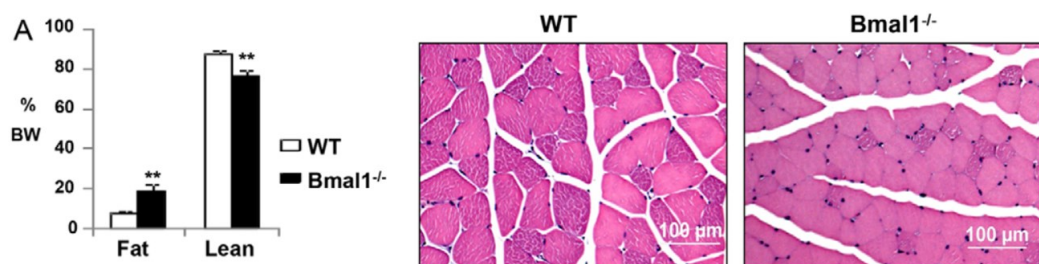
hladiny nad obvyklou úroveň má za následek zvýšenou proliferaci a životaschopnost preadipocytů. Pokud však byla v podmínkách vyšší exprese *Clock* inhibována Wnt signalizační kaskáda, nárůst buněčného dělení nebyl pozorován (Zhu *et al.*, 2016).

Dalším hodinovým proteinem, jehož role v proliferaci preadipocytů byla prokázána, je jaderný receptor REV-ERB $\alpha$ . Výsledkem přidání agonisty REV-ERB $\alpha$  do kultury preadipocytů je snížení hladiny CycD a  $\beta$ -kateninu a zvýšená exprese p27. Proliferace buněk je tak zastavena skrz inhibici G<sub>1</sub>/S přechodu. I tady hraje pokles aktivity kanonické Wnt signalizace důležitou roli. REV-ERB $\alpha$  může preadipocytům také pomoci vstoupit do apoptózy. To bylo ukázáno na pokusu, kdy byla ke kultuře nejprve přidána kyselina palmitová, která apoptózu indukovala. Následnou stimulací aktivity REV-ERB $\alpha$  došlo k detekci vyšší koncentrace proapoptotických faktorů a k úbytku živých buněk oproti kontrole (Chu *et al.*, 2019).

### 5.3 Svalová tkáň

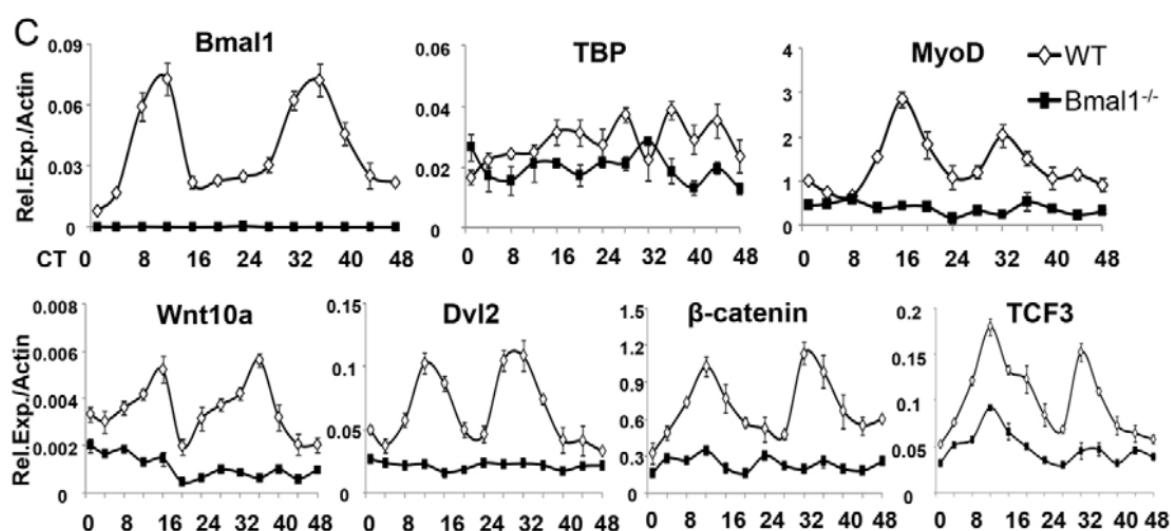
Kosterní svalovina je tvořena podlouhlými mnohojadernými buňkami, svalovými vlákny. Je jednou z tkání, které si i v dospělosti zachovávají velmi dobrou schopnost regenerace. Myogeneze je regulována faktory jako je MyoD1 (myogenic differentiation 1), Myf5 (myogenic factor 5) nebo myogenin, a hlavním signálem, který vývoj a růst svalových vláken spouští, je aktivace Wnt dráhy (shrnutí v Rudnicki and Williams, 2016).

Kosterní svalstvo je také sídlem periferních cirkadiálních hodin (shrnutí v Harfmann, Schroder and Esser, 2015). Bylo prokázáno, že hodinový protein BMAL1 má pozitivní vliv na myogenezi. U myši s delecí genu *Bmal1*, došlo ke snížení celkové svalové hmoty v důsledku redukce svalových vláken. Myoblasty, ve kterých byla exprese *Bmal1* utlumena, vykazovaly sníženou expresi myogenních regulačních faktorů a přišly tak o schopnost diferenciaci. Když byla naopak exprese *Bmal1* v myoblastech navýšena, vedlo to k nárůstu hladiny myogenních faktorů a vyšší míře tvorby nových svalových vláken (Chatterjee *et al.*, 2013).



Obrázek 10: Nepřítomnost funkčního genu *Bmal1* u myši způsobí redukci celkové svalové hmoty a nárůst hmoty tukové tkáně (Guo *et al.*, 2012). Svalová vlákna mají menší průměr oproti kontrole (WT). (Zdroj: Chatterjee *et al.*, 2013)

Regulace myogeneze pomocí BMAL1 je zřejmě zprostředkována kanonickou signalizací Wnt/ $\beta$ -katenin. V myoblastech, ve kterých byl utlumen gen *Bmal1*, došlo také k oslabení aktivity Wnt signalizace a ke snížení hladiny mRNA proteinů WNT10A, DVL2,  $\beta$ -katenin a TCF3. Geny těchto proteinů totiž obsahují cílovou sekvenci transkripčního faktoru BMAL1 a v jeho přítomnosti také vykazují rytmickou expresi. Když byl ke kultuře myoblastů postrádajících funkční gen *Bmal1* přidán ligand WNT3A nebo inhibitor kinázy GSK3 $\beta$ , schopnost jejich diferenciace se obnovila pouze částečně. Důvodem může být např. to, že BMAL1 reguluje expresi více komponent Wnt signalizace, z nichž mnohé fungují později v rámci kaskády přenášející signál až na úroveň transkripce v buněčném jádře (Chatterjee *et al.*, 2013).



Obrázek 11: Geny pro WNT10A, DVL2,  $\beta$ -katenin, TCF3 a MyoD jsou exprimovány rytmicky, ve fázi shodné s expresí genu *Bmal1*. TBP (TATA-binding protein) byl použit jako kontrola. (Zdroj: Chatterjee *et al.*, 2013)

Studie z roku 2019 zkoumala, jakou roli má v procesu myogeneze protein REV-ERB $\alpha$  (Chatterjee *et al.*, 2019). Ukázalo se, že je také schopen regulovat transkripci genů některých komponent Wnt signalizace. Vazebná místa RORE se nachází např. v genech pro WNT10A, FZD5, LRP6, DVL2 nebo TCF3. Účinek jím zprostředkované regulace je však opačný oproti tomu, který je vyvolán transkripčním faktorem BMAL1. Aktivace REV-ERB $\alpha$  má za následek utlumení proliferace a diferenciace myoblastů. Jeho inhibice naopak vede ke zvýšené míře dělení a maturaci prekurzorových buněk, a napomáhá tak také regeneraci svalu po jeho poranění. Snížení hladiny REV-ERB $\alpha$  se navíc projeví také nárůstem exprese *Bmal1*, a tak ještě podpoří tento efekt (Chatterjee *et al.*, 2019).



## 5.4 Kostní tkáň

Stejně jako adipocyty a myocyty, vznikají i buňky kostní tkáně z multipotentních mezenchymálních kmenových buněk. Proces osteogenní diferenciace, ve kterém se z nich vyvíjejí osteoblasty a následně osteocyty, zahrnuje proliferaci, maturaci a mineralizaci. Hlavními osteogenními transkripčními faktory jsou proteiny RUNX2 (runt-related transcript factor 2), ALP (alkaline phosphatase), OSX (osterix), COL1 $\alpha$ 1 (collagen type I  $\alpha$  1) a OC (osteocalcin). V dospělých kostech dochází k neustálé remodelaci, tedy odstraňování staré a formaci nové kostní tkáně. Důležitou roli při tom hraje rovnováha mezi aktivitou osteoblastů a osteoklastů (shrnutí v Katsimbri, 2017).

Diferenciace osteoblastů je regulována Wnt signální dráhou, kdy pokud je aktivován  $\beta$ -katenin, dojde k zvýšení hladiny osteogenních transkripčních faktorů (Day *et al.*, 2005). Wnt signalizace má navíc schopnost podporovat diferenciované osteoblasty v inhibici formace osteoklastů (Glass II *et al.*, 2005). Účastní se tak plně přestavby kostní tkáně.

Roli v remodelaci kostí mají i hodinové geny. Osud osteoblastů určuje např. gen *Clock*. Pokud je mutován, je zablokována osteogeneze a dochází častěji k apoptotickému odumírání buněk (Yuan *et al.*, 2017). Gen *Bmal1* ovlivňuje proliferaci mezenchymálních kmenových buněk a tedy množství osteoblastů. U starších myší postupně klesá hladina BMAL1, snižuje se také proliferace prekurzorových buněk a koncentrace osteogenních faktorů (Chen *et al.*, 2012). S přibývajícím věkem je také pozorována klesající míra aktivace Wnt signalizace (Zhang *et al.*, 2011). Pokud je v buňkách kostní tkáně inhibována Wnt signalizace, dochází k potlačení proliferace a osteogeneze. Když však v těchto buňkách zvýšíme expresi *Bmal1*, do jisté míry se tento efekt vyruší a je pozorován malý nárůst diferenciace, např. částečná kalcifikace. Je zajímavé, že změny v hladinách exprese *Bmal1* naznačují jeho účast při regulaci osteogeneze pouze v určité její fázi (He *et al.*, 2013).

Studie publikovaná v roce 2018 ukazuje, že hodinový gen *Cry1* ovlivňuje diferenciaci lidských osteoblastů skrz kanonickou Wnt/ $\beta$ -katenin signalizaci (Zhou *et al.*, 2018). Při zvýšené expresi *Cry1* byla zaznamenána vyšší míra proliferace a diferenciace osteoblastů, vyšší exprese osteogenních transkripčních faktorů (RUNX2, ALP, OSX, COL1 $\alpha$ 1, OC) a také zvýšená extracelulární mineralizace. Naproti tomu snížení exprese *Cry1* vedlo k poklesu exprese osteogenních faktorů, oslabení diferenciace osteoblastů a snížené proliferaci buněk. V buňkách se zvýšenou expresí *Cry1* byla také detekována vysoká hladina  $\beta$ -kateninu v cytoplazmě i v jádře. Nabízelo se tedy, že by *Cry1* mohl řídit buněčný osud osteoblastů právě přes kanonickou Wnt dráhu. To bylo potvrzeno inhibicí  $\beta$ -kateninu,

po které došlo k zablokování osteogeneze i v buňkách se zvýšenou expresí *Cry1* (Zhou *et al.*, 2018).

Jiná studie se zabývala rolí genu *Cry2* v regulaci rozvoje lidského osteosarkomu. Bylo zjištěno, že pokud je utlumena exprese *Cry2*, v kultuře se sníží počet buněk v G<sub>1</sub> fázi a přibude buněk v S fázi. Buňky osteosarkomu se tedy více dělí a migrují. Tyto změny jsou zřejmě mimo jiné zprostředkovány kanonickou Wnt signalizací, jelikož bylo pozorováno také zvýšení hladiny  $\beta$ -kateninu (Yu *et al.*, 2018). Utlumení genu *Cry1* tedy vede ke snížení míry proliferace, utlumení *Cry2* způsobí naopak zvýšenou proliferaci buněk. Oba tyto geny jsou pod transkripční kontrolou CLOCK/BMAL1. Jak je tedy možné, že mají naprosto opačný efekt, když víme, že snížená exprese *Clock* i *Bmal1*, vede ke snížení proliferace a osteogeneze? Zdá se, že *Cry2* má schopnost modulovat hladinu exprese ostatních hodinových genů, včetně genu *Cry1*. V buňkách osteosarkomu, ve kterých byla utlumena exprese *Cry2*, bylo detekováno více mRNA *Cry1*, *Per1*, *Per2*, *Bmal1* i *Clock* (Yu *et al.*, 2018). Mechanismus jeho působení na ostatní hodinové geny není znám, ale dokazuje to, že *Cry2* má v regulaci proliferace a diferenciace buněk kostní tkáně důležitou negativní úlohu.

Pozornost byla věnována také vlivu REV-ERB $\alpha$  na proliferaci a osteogenezi mezenchymálních kmenových buněk (He *et al.*, 2015). Pokud u nich byla indukována osteogeneze, hladina REV-ERB $\alpha$  klesla. V buňkách, ve kterých byla exprese REV-ERB $\alpha$  zvýšena, byl pozorován pokles hladiny  $\beta$ -kateninu a osteogenního faktoru BSP (bone sialoprotein) typického pro pozdní diferenciaci, ubylo také buněk v S fázi a bylo zaznamenáno vyšší množství stárnoucích buněk. REV-ERB $\alpha$  tedy inhibuje proliferaci i osteogenezi a podporuje stárnutí mezenchymálních kmenových buněk přes Wnt/ $\beta$ -katenin signalizaci. Dokázáno to bylo přidáním exogenního WNT3A ke kultuře buněk se zvýšenou expresí REV-ERB $\alpha$ . V takovém případě totiž vzrostla aktivita Wnt signalizace, zvýšila se hladina  $\beta$ -kateninu, efekt REV-ERB $\alpha$  byl částečně potlačen a proliferace buněk byla mírně obnovena. Zároveň byla naměřena nižší hladina proteinu REV-ERB $\alpha$ . Předpokládá se, že mechanismus, který hodinový protein REV-ERB $\alpha$  a Wnt signalizaci spojuje, vede přes kinázu GSK3 $\beta$ . Při zvýšené expresi REV-ERB $\alpha$  je zaznamenána také vyšší exprese GSK3 $\beta$  (He *et al.*, 2015). Tato kináza fosforyluje a tím stabilizuje REV-ERB $\alpha$  (Yin *et al.*, 2006), čímž dojde k inhibici *Bmal1*. GSK3 $\beta$  zároveň fosforylaci  $\beta$ -kateninu napomáhá jeho degradaci v proteasomu. Celkově tak zvýšení její hladiny vede k inhibici proliferace mezenchymálních kmenových buněk a osteogeneze.

## 5.5 Fibroblasty

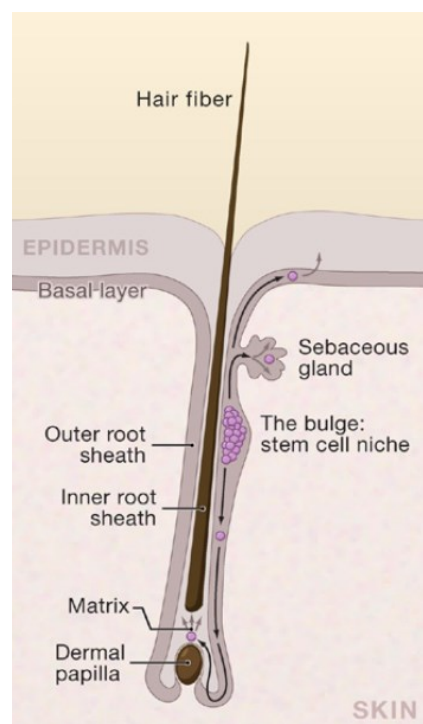
Přítomnost buněčně-autonomních cirkadiánních hodin byla prokázána také u fibroblastů (Nagoshi *et al.*, 2004). Studie z roku 2013 popisuje, že hodinový gen *Bmal1* ovlivňuje jejich proliferaci, a to skrz aktivaci kanonické Wnt dráhy (Lin *et al.*, 2013). V buňkách NIH-3T3 byla za pomoci transfekce zvýšena exprese *Bmal1*. Vedlo to k výraznému nárůstu dělení buněk a také k zvýšení hladiny mRNA  $\beta$ -kateninu. Práce je, co se týče zaměření a provedení, u fibroblastové linie ojedinělá a nelze ji tak srovnat s dalšími výsledky. Nicméně tento trend byl pozorován u jiných buněčných linií (viz tuková, svalová a kostní tkáň), a tak lze předpokládat, že by mohl být platný také zde.

Existuje i jiná studie, která popisuje význam Wnt signalizace při zvýšené proliferaci fibroblastů, jako důsledek narušení hodinového systému (Yasuniwa *et al.*, 2010). V tomto případě se však jednalo o pokus *in vivo* a nebylo použito manipulace s konkrétním hodinovým genem, nýbrž byly porovnávány skupiny myši chovaných buď v podmínkách střídání světa a tmy v intervalech 12 hodin, nebo za podmínek konstantního světla. Nádory vyvolané vpravením buněk HeLa produkovaly za podmínek konstantního světla větší množství extracelulární matrix. Narušení cirkadiánních rytmů totiž vedlo k zvýšené expresi WNT10A a ten působil na fibroblasty jako růstový faktor.

## 5.6 Epidermis

Pokožka je jednou z tkání lidského těla, které podléhají velmi rychlé obnově. Její obměna u člověka trvá přibližně dva týdny. Za udržování pokožkové homeostázy zodpovídají multipotentní epidermální kmenové buňky, které sídlí ve speciální části vlasového folikulu. Odtud mohou migrovat a dávat vznik vlasovým keratinocytům a vlastním buňkám folikulu, dále buňkám mazových žláz a kmenovým buňkám interfolikulární epidermis (shrnutí v Alonso and Fuchs, 2003).

Obrázek 12: Kořen vlasu je ve folikulu obalen vnitřní a vnější pochvou, navazující na epidermis. Buňky matrix ve spodní části folikulu se dělí a dávají vznik vlasovým buňkám i buňkám vnější pochvy. Dermální papila, která je tvořena specializovanými mezenchymálními buňkami a obklopena buňkami matrix, je zásadní pro tvorbu folikulu. Epiteliální kmenové buňky jsou uloženy ve speciální doméně folikulu. Odtud migrují a vytváří jak mazové žlázy a epidermis, tak buňky matrix. (Zdroj: Clevers, 2006)



Pro správnou funkci folikulu je zásadní Wnt signalizace. Vyvolanou stabilizací  $\beta$ -kateninu dojde k aktivaci epidermálních kmenových buněk a jejich dočasně synchronizované proliferaci (Lowry *et al.*, 2005). Mnoho genů specifických pro morfogenezi vlasových folikulů ve svém promotoru obsahuje vazebnou sekvenci pro LEF a je tedy také řízeno Wnt signalizací (Zhou *et al.*, 1995). U myši, u které je během vývoje Wnt signalizační dráha epiteliálních buněk inhibována, chlupové folikuly zcela chybí (Andl *et al.*, 2002). Dospělá myš nesoucí mutaci v genu pro  $\beta$ -katenin vykazuje poruchy tvorby chlupových keratinocytů a namísto nich se z epidermálních kmenových buněk tvoří buňky interfolikulární epidermis (Huelsken *et al.*, 2001). Signalizace Wnt/ $\beta$ -katenin je tedy pro pokožku klíčová po celou dobu života jedince a reguluje nejen expanzi prekurzorových buněk, ale také jejich terminální diferenciaci.

Také v kožních buňkách byly popsány funkční cirkadiánní hodiny (Bjarnason *et al.*, 2001). V lidských epidermálních keratinocytech jsou jednotlivé hodinové geny aktivní v určitých fázích dne a vytváří tak různé časové intervaly, pro které je typická exprese konkrétních genů regulujících proliferaci a diferenciaci epidermálních kmenových buněk. Např. na diferenciací stimuly odpovídají během pozdní noci nebo časného rána. Mitózou naopak procházejí během pozdního odpoledne nebo začátku noci (Janich *et al.*, 2013). Na myším modelu bylo ukázáno, že BMAL1 hraje klíčovou roli v regulaci a koordinaci buněčné proliferace a metabolismu pokožky. Expres genů spojených s metabolickými ději byla v opačné fázi oproti genům účastnících se buněčného cyklu. Také produkce ROS (reactive oxygen species) se během dne cyklicky měnila a to v opačné fázi oproti rytmickým změnám v počtu buněk v S fázi. Delece *Bmal1* v interfolikulárních pokožkových buňkách vede ke ztrátě rytmu v hladině ROS i synchronizaci buněčného dělení v závislosti na denní době. Jak hladina ROS, tak buněčná proliferace, jsou pak stále zvýšené. Za fyziologického stavu má tedy BMAL1 zřejmě za úkol potlačovat během dne proliferaci interfolikulárních epidermálních buněk (Geyfman *et al.*, 2012). Cirkadiánní hodiny jsou také schopné modulovat časování cyklických procesů, které běží s periodou delší než 24 hodin. To bylo ukázáno na příkladu cyklování folikulů a růstu chlupů u myši. Vliv hodinových genů na růst chlupu je zprostředkován přes jejich efekt na buněčný cyklus. Mutace v genu *Bmal1* vede k zastavení buněčného cyklu folikulárních keratinocytů v G<sub>1</sub> fázi (Lin *et al.*, 2009). Epidermální kmenové buňky folikulu se střídavě aktivují a deaktivují. Aktivní se však stává pouze jejich část. Rolí cirkadiánních hodin v tomto procesu se zabývala studie z roku 2011 (Janich *et al.*, 2011). V dormantním stavu vykazovala cirkadiánní expresi hodinového genu *Per1* přibližně polovina kmenových buněk folikulu. Se začátkem růstové fáze se

začala exprese *Per1* navyšovat, až byla nakonec detekována přibližně v 90 % epidermálních kmenových buněk. Analýza transkriptomu odhalila, že se buňky, ve kterých jsou hodiny aktivní, liší expresí řady genů klíčových pro epidermální homeostázu, a to i v době před jejich růstovou aktivací. Exprimují mimo jiné vyšší hladiny genů Wnt signalizace jako např. *Fzd2*, *Fzd3*, *Lgr5*, *Lef1*, *Dkk3* (dickkopf-3) a další. Bylo také potvrzeno, že některé z těchto genů přímo obsahují vazebné místo pro BMAL1/CLOCK ve svém promotoru. V pokusu, kdy byl vyřazen gen *Bmal1*, byly buňky arytmičné, exprimovaly nižší hladiny genů účastnících se Wnt signalizace a většinou byly v dormantním stavu. Naopak delece *Per1/2*, kdy hodiny nebyly zpětně inhibovány, vedla k zvýšené proliferaci folikulárních kmenových buněk a vyšší expresi cílových genů. Hodiny jsou tedy zřejmě schopné určit, skrz dráhy jako je Wnt, populace epiteliálních kmenových buněk, které jsou více či méně náchylné k aktivaci a následné proliferaci. Chrání tak niku, ve které kmenové buňky sídlí, aby nedošlo k aktivaci všech, a aspoň část jich vždy zůstávala zachována (Janich *et al.*, 2011).

## 5.7 Hematopoetický systém

Hematopoetické kmenové buňky mohou dát vznik všem krevním buněčným liniím. U dospělého savčího organismu je najdeme především v kostní dřeni, jsou ale schopné svou niku opustit, vyputovat do krevního řečiště a následně se zase vrátit. Mobilita hematopoetických kmenových buněk je regulována pomocí receptoru CXCR4 (C-X-C motif chemokine receptor 4) přítomným na jejich povrchu. Jeho ligandem je CXCL12 (C-X-C motif chemokine ligand 12), který je produkován stromálními buňkami kostní dřene a jeho přítomnost udržuje kmenové buňky ve své nise (shrnutí v Morrison and Scadden, 2014).

Uvolnění hematopoetických kmenových buněk z kostní dřene do krevního řečiště je regulováno cirkadiánními hodinami skrz expresi *Cxcl12*. Jak hladina hematopoetických kmenových buněk, tak exprese *Cxcl12*, vykazuje cirkadiánní rytmické fluktuace, a ty jsou vzájemně v opačné fázi. Oba rytmy jsou také ovlivněny změnou světelného režimu. Cirkadiánní změny v expresi *Cxcl12* jsou závislé na rytmické sekreci noradrenalinu z nervových zakončení sympatiku, jsou tedy řízeny hodinami z centrálního nervového systému (Méndez-Ferrer *et al.*, 2008). Současně se systémovým řízením, je vyplavování hematopoetických kmenových buněk ovlivňováno také na buněčně specifické úrovni. Důležitou roli při tom hraje kináza GSK3 $\beta$ . Ta je také exprimována rytmicky v průběhu dne a je ve fázi shodné s uvolňováním hematopoetických kmenových buněk do krve.

Hladina GSK3 $\beta$  se v kmenových buňkách zvyšuje po stimulaci noradrenalinem a zdá se, že tento děj předchází jejich vyplavení. U nezralých kmenových buněk je míra její exprese vyšší v porovnání s buňkami zralými. Inhibice GSK3 $\beta$  nemá na migraci jako takovou efekt, protože hladina obíhajících zralých leukocytů se po ní nezmění. Způsobí však snížení počtu prekurzorových hematopoetických kmenových buněk v krvi. V dalších pokusech bylo ukázáno, že kináza GSK3 $\beta$  funguje nezávisle na receptorech CXCR4, jejichž hladina se v závislosti na změnách exprese kinázy nemění. Aktivita GSK3 $\beta$  tedy se systémem regulace CXCL12/CXCR4 spolupracuje a má přednostní vliv na nezralé kmenové buňky (Lapid *et al.*, 2013).

Kináza GSK3 $\beta$  je také součástí Wnt signalizační kaskády. Wnt signalizace je důležitá především pro sebeobnovu hematopoetických kmenových buněk a má vliv na jejich proliferaci a diferenciaci. Exprese  $\beta$ -kateninu vede k jejich zvýšené proliferaci a působí negativně na jejich diferenciaci (Reya *et al.*, 2003). Také v tomto typu buněk by tedy mohla existovat souvislost mezi hodinami a buněčným cyklem vedoucí přes Wnt signalizaci. Zda tato interakce skutečně existuje, však zatím není jasné.

## 5.8 Nervová tkáň

Neurogeneze, proces tvorby nových neuronů z prekurzorových buněk, u savců probíhá nejen během vývoje ale i v dospělosti. U dospělého organismu k ní dochází v konkrétních částech centrálního nervového systému, a to především v subventrikulární zóně laterální komory a v subgranulární zóně v *gyrus dentatus* hipokampu. Neurální kmenové buňky proliferují a mění se na buňky progenitorové. Ty následně procházejí diferenciací a migrují na cílové místo, kde vytvářejí výběžky a synapse s ostatními neurony. Proliferace a diferenciace neurálních kmenových buněk je řízena mimo jiné Wnt signalizací. Proteiny WNT jsou produkovány astrocyty hipokampu a jejich působením se neurální kmenové buňky přeměňují v neurony. Tyto kmenové buňky sami o sobě exprimují sFRP3 (secreted frizzled-related protein 3), který působí proti Wnt-signalizaci vyvolané diferenciací, což napomáhá udržování rovnováhy (shrnutí v Lie *et al.*, 2004; Ming and Song, 2005). Neurogeneze u dospělých savců je zřejmě také pod vlivem cirkadiálních hodin. Bylo například ukázáno, že v myším hipokampu během dne dochází ke změnám počtu buněk v M fázi a jejich nárůst je doprovázen zvýšením počtu nových neuronů (Tamai, Sanada and Fukada, 2008).

Studie, naznačující možné propojení mezi cirkadiálními hodinami a Wnt signalizací v procesu tvorby neuronů, se věnovala roli hodin v rozvoji ADHD (attention-

deficit/hyperactivity disorder) a jako modelový organismus si vybrala *Danio rerio* (Huang *et al.*, 2015). Ryby, u kterých byl vyřazen gen *perl1b*, ortologní k savčímu *Per1*, vykazovaly mnoho charakteristik shodných právě s pacienty trpícími touto chorobou. Byly hyperaktivní, impulzivní, méně obezřetné, se špatnou pamětí a menší schopností učit se, značící také sníženou soustředěnost. Vyřazení *perl1b* způsobilo také výrazné snížení hladiny dopaminu v mozku dospělých jedinců. Gen *mao*, který kóduje monoaminooxidázu degradující dopamin, je pod přímou kontrolou cirkadiálních hodin a za normálních okolností je exprimován rytmicky. U mutantních jedinců je však jeho exprese výrazně navýšena. Stejně je to i u genu *dbh*, který kóduje dopamin- $\beta$ -hydroxylázu katalyzující přeměnu dopaminu na noradrenalin. Kromě regulace hladiny dopaminu je gen *perl1b* důležitý také pro normální vývoj dopaminergních neuronů. Jejich počet je u *perl1b* mutantních ryb výrazně redukován, jelikož exprese genů účastnících se jejich diferenciace, vývoje a udržování je snížena. Mezi tyto geny patří mimo jiné geny Wnt signalizace: *wnt1*, *wnt3a* a *wnt5a*. Způsob, jakým *Per1b* tyto geny reguluje, však prozatím není známý (Huang *et al.*, 2015).

## 6 Cirkadiánní hodiny, Wnt signalizace a nádorové bujení

Cirkadiánní hodiny se účastní regulace řady klíčových buněčných pochodů včetně buněčného cyklu, odpovědi na poškození DNA a apoptózy. Jejich narušení tedy může vést ke zvýšené proliferaci a změnám v metabolismu buněk, podobně jako je tomu u buněk nádorových. Toto tvrzení je podpořeno také výsledky pozorování, kdy mutace v některém z genů *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* nebo *Cry2* vede k vyšší míře tvorby nádorů.

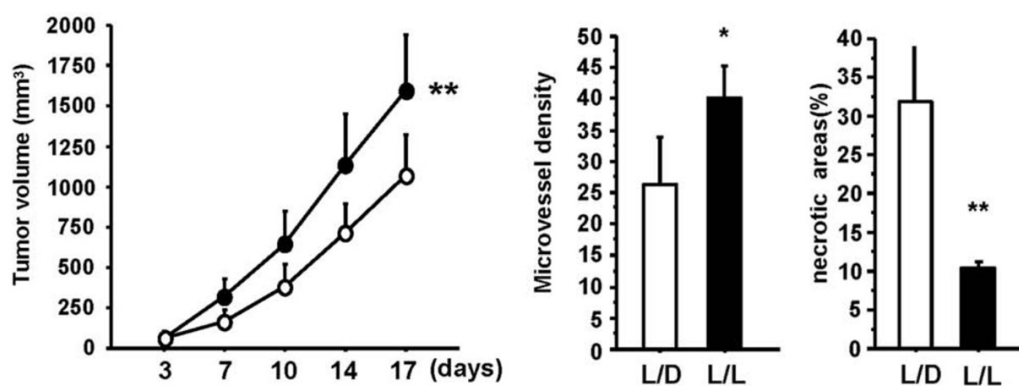
Nádorová transformace je často spojena s procesy nestandardní diferenciaci nebo dediferenciaci. Některé nádorové buňky tedy vykazují vlastnosti shodné s embryonálními kmenovými buňkami, jako např. neomezenou dělivou schopnost, podobné metabolické nároky a epigenetické modifikace. Právě epigenetika by mohla vysvětlovat skutečnost, že většina hodinových genů je v několika typech rakovinných buněk exprimována odlišně oproti buňkám zdravým. Zjistilo se totiž, že v některých nádorech jsou promotory genů *Bmal1*, *Per1*, *Per2* a *Cry1* nadměrně metylovány (shrnutí v Tsuchiya, Umemura and Yagita, 2020).

Svou roli v rozvoji nádorů má i Wnt signalizace. V lidských rakovinných buňkách jsou často pozorovány právě mutace v některé z jejích komponent. Nejlépe popsáním příkladem je kolorektální karcinom, který je ve většině případů zapříčiněn mutací v genu pro APC. Pro udržování nádoru je důležité, aby byla Wnt signalizace aktivní kontinuálně. Pokud dojde k obnovení funkce APC a dráha vedoucí přes  $\beta$ -katenin je tak inhibována, mohou se také buňky adenomu vrátit zpět do podoby buněk zdravé tkáně. Kromě nádorů gastrointestinálního traktu je Wnt signalizace deregulována také např. ve většině leukemií, melanomů nebo karcinomů prsu (shrnutí v Zhan, Rindtorff and Boutros, 2017).

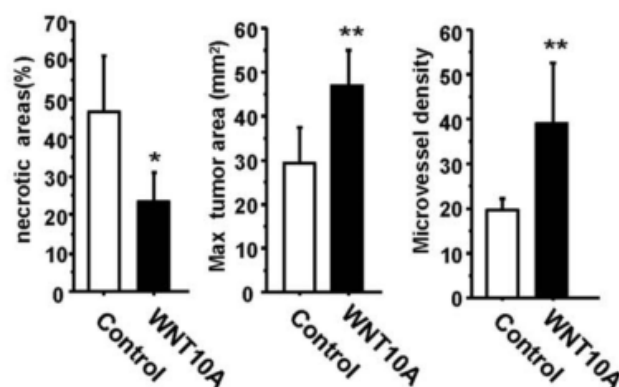
Přímé zapojení Wnt signálační dráhy v rozvoji nádoru způsobeném narušením cirkadiánního systému popisuje studie z roku 2010 (Yasuniwa *et al.*, 2010). Do myši byly vpraveny lidské epiteliální nádorové buňky HeLa. Následně byly rozděleny do dvou skupin: první skupina myši byla chována za podmínek konstantního světla (L/L), druhá byla v podmínkách střídajících se 12 hodin světla a 12 hodin tmy (L/D). Nádory se vytvořili u obou skupin myši, avšak u skupiny chované v režimu L/L dosahovaly větších rozměrů, obsahovaly větší množství cév, došlo u nich k expanzi extracelulární matrix a klesl výskyt nekrózy. Přestože byla v L/L zaznamenána vyšší úroveň angiogeneze, VEGF (vascular endothelial growth factor), nejdůležitější faktor, který tvorbu cév podporuje, byl u obou skupin exprimován stejně. Byl ale pozorován rozdíl v expresi WNT10A. Ta byla výrazně vyšší u skupiny v podmínkách L/L oproti skupině v L/D. Vznikla tedy hypotéza,



že by za morfologické změny nádorů mohla být zodpovědná právě tato extracelulární signální molekula. V dalším pokusu byly do myši vpraveny buňky HeLa, které exprimovaly vysoké hladiny WNT10A. V podmínkách *in vitro* byla rychlost růstu buněk exprimujících vyšší hladiny WNT10A srovnatelná s těmi, které byly použity v původním experimentu. *In vivo* však vyvolaly nádory, které rostly rychleji a obsahovaly daleko vyšší množství cév v porovnání s původním experimentem, a to jak v podmínkách L/L, tak L/D. U obou skupin myši byla také měřena hladina 8-OH deoxyguanosinu jako ukazatel míry oxidativního stresu. V plicích skupiny chované v podmínkách L/L byla hladina 8-OH deoxyguanosinu výrazně vyšší než u skupiny z L/D. Bylo také ukázáno, že hladina WNT10A se zvýší po aplikaci peroxidu vodíku, který působí jako oxidační činidlo. Zdá se tedy, že by narušení cirkadiálního rytmu mohlo vést ke zvýšení oxidativního stresu, což by vedlo k nárůstu hladiny WNT10A. WNT10A by následně podpořil angiogenezi a expanzi extracelulární matrix a tedy i růst nádoru (Yasuniwa *et al.*, 2010).



Obrázek 13: Nádor vyvolaný buňkami HeLa. První graf porovnává velikosti podkožních nádorů u myši chovaných v podmínkách L/L (plný bod) a L/D (prázdný bod). Ukazuje tedy, že nádory u myši chovaných v podmínkách L/L rostou rychleji. Druhý a třetí graf znázorňují, že se v těchto rychleji rostoucích nádorech také tvoří větší množství nových cév a klesá míra nekrózy. (Zdroj: Yasuniwa *et al.*, 2010)



Obrázek 14: Nádor vyvolaný buňkami HeLa. Stejného efektu může být dosaženo také zvýšením hladiny exprese WNT10A. (Zdroj: Yasuniwa *et al.*, 2010)

## 7 Závěr

Cirkadiánní hodiny a buněčný cyklus jsou dva cyklicky se opakující fyziologické procesy, které jsou schopné vzájemně se ovlivňovat. Dříve se výzkum věnoval především tomu, jakým způsobem spolu interagují uvnitř jedné buňky. V posledních letech však vzrostl zájem také o jejich mezibuněčné propojení. Cílem této práce bylo shrnout výsledky publikovaných studií, které se jejich intercelulárním propojením zabývaly, a ukázat, že Wnt signalizace je klíčovým mechanismem, který je schopný tuto interakci zprostředkovat. Exprese mnohých komponent Wnt signalizace je pod přímou kontrolou cirkadiánních hodin, jelikož jejich geny obsahují sekvence E-box nebo RORE. Proteiny Wnt dráhy jsou tak exprimovány rytmicky v průběhu dne. Hodiny a Wnt signalizační dráha spolu souvisí také díky tomu, že sdílejí stejné regulační molekuly, jako je kináza GSK3 $\beta$ .

Cirkadiánní hodiny i Wnt signalizace působí specificky v závislosti na typu konkrétní tkáně, kde spouští transkripci cílových genů. Dobrým příkladem je jejich vliv na prekursorové buňky tkáně tukové, kostní a svalové, vznikající z mezenchymálních kmenových buněk. Aktivace Wnt signalizační kaskády v prekurzorech buněk kostí a svalů vede k jejich diferenciaci a vyšší míře růstu, zatímco v tukové tkáni má na diferenciaci buněk negativní účinek. Její vliv na proliferaci buněk se však zdá být pozitivní nejen v tkáni kostní a svalové, ale také v tkáni tukové, ve střevním epitelu, v buňkách hematopoetických, fibroblastových, epidermálních nebo nervových. Manipulace s geny cirkadiánních hodin měla na Wnt signalizaci ve většině prací shodný účinek. Vyšší aktivity Wnt dráhy bylo docíleno vždy po zvýšení exprese *Bmal1* a *Clock* nebo po utlumení exprese genu pro REV-ERB $\alpha$ . Rozdílných výsledků se však dočkaly studie, které měnily expresi genu *Cry1* v tukové a kostní tkáni. Zatímco v tukové tkáni se aktivita Wnt signalizace zvýšila po utlumení exprese *Cry1*, v tkáni kostní bylo stejného účinku docíleno navýšením exprese tohoto genu. Tato pozorování opět ukazují na to, že i cirkadiánní hodiny vykazují tkáňovou specifitu a mohou tak podporovat specifické působení Wnt signalizace.

Pochopení interakcí mezi cirkadiánními hodinami a Wnt signalizací má velký význam pro klinickou praxi. Oba tyto systémy jsou často deregulovány u různých nádorových onemocnění a jejich narušení může zřejmě nádor také vyvolat. Na základě znalostí získaných studiem této oblasti bychom mohli být schopni určit vhodnou denní dobu pro aplikaci léků a docílit tak efektivnější nádorové chemoterapie.

## 8 Seznam použité literatury

Aberle, H. *et al.* (1997) 'β-catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway', *The EMBO Journal*, 16(13), pp. 3797–3804. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3797>.

\*Akerstedt, T. *et al.* (1984) 'Shift work and cardiovascular disease', *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 10(6 SPEC. ISS.), pp. 409–414. doi: 10.5271/sjweh.2302.

\*Alonso, L. and Fuchs, E. (2003) 'Stem cells in the skin: waste not, Wnt not', *Genes and Development*, 17, pp. 1189–1200. doi: 10.1101/gad.1086903.that.

Alvarez, B. *et al.* (1992) 'The delayed sleep phase syndrome: Clinical and investigative findings in 14 subjects', *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 55(8), pp. 665–670. doi: 10.1136/jnnp.55.8.665.

Andl, T. *et al.* (2002) 'WNT signals are required for the initiation of hair follicle development', *Developmental Cell*, 2(5), pp. 643–653. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00167-3.

Antoch, M. P. *et al.* (1997) 'Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue', *Cell*, 89(4), pp. 655–667. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80246-9.

Barker, N. *et al.* (2007) 'Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5', *Nature*, 449, pp. 1003–1007. doi: 10.1038/nature06196.

Bilić, J. *et al.* (2007) 'Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation', *Science*, 316(5831), pp. 1619–1622. doi: 10.1126/science.1137065.

Bjarnason, G. A. *et al.* (2001) 'Circadian Expression of Clock Genes in Human Oral Mucosa and Skin Association with Specific Cell-Cycle Phases', *American Journal of Pathology*, 158(5), pp. 1793–1801. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64135-1.

\*Bjarnason, G. A. and Jordan, R. (2002) 'Rhythms in Human Gastrointestinal Mucosa and Skin', *Chronobiology International*, 19(1), pp. 129–140.

Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, pp. 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.

\*Brown, W. R. (1991) 'A review and mathematical analysis of circadian rhythms in cell proliferation in mouse, rat, and human epidermis', *Journal of Investigative Dermatology*, pp. 273–280. doi: 10.1111/1523-1747.ep12480379.

Chan, A. B., Huber, A. and Lamia, K. A. (2020) 'Cryptochromes modulate E2F family transcription factors', *Scientific Reports*. Springer US. doi: 10.1038/s41598-020-61087-y.

Chatterjee, S. *et al.* (2013) 'Brain and muscle Arnt-like 1 is a key regulator of myogenesis', *Journal of Cell*, 126, pp. 2213–2224. doi: 10.1242/jcs.120519.

Chatterjee, S. *et al.* (2019) 'The Nuclear Receptor and Clock Repressor Rev-erb  $\alpha$  Suppresses Myogenesis', *Scientific Reports*, 9. doi: 10.1038/s41598-019-41059-7.

Chen, Y. *et al.* (2012) 'Age-related BMAL1 change affects mouse bone marrow stromal cell proliferation and osteo-differentiation potential', *Archives of Medical Science*, 8(1), pp. 30–38. doi: 10.5114/aoms.2012.27277.

Christodoulides, C. *et al.* (2006) 'WNT10B mutations in human obesity', *Diabetologia*, 49(4), pp. 678–684. doi: 10.1007/s00125-006-0144-4.WNT10B.

Chu, G. *et al.* (2019) 'Rev-erb $\alpha$  inhibits proliferation and promotes apoptosis of preadipocytes through the agonist GSK4112', *International Journal of Molecular Sciences*, 20. doi: 10.3390/ijms20184524.

\*Clevers, H. (2006) 'Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease', *Cell*, 127, pp. 469–480. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.018.

\*Crncec, A. (2019) 'Triggering mitosis', *FEBS Lett.*, 593, pp. 2868–2888. doi: 10.1002/1873-3468.13635.

\*Dalton, S. and Coverdell, P. D. (2016) 'Linking the cell cycle to cell fate decision', *Trends in Cell Biology*, 25(10), pp. 592–600. doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.007.Linking.

Daniels, D. L. and Weis, W. I. (2005) ' $\beta$ -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation', *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(4), pp. 364–371. doi: 10.1038/nsmb912.

\*Davidson, G. and Niehrs, C. (2010) 'Emerging links between CDK cell cycle regulators and Wnt signaling', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 20(8), pp. 453–460. doi: 10.1016/j.tcb.2010.05.002.

Davis, S., Mirick, D. K. and Stevens, R. G. (2001) 'Night Shift Work, Light at Night, and Risk of Breast Cancer', *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), pp. 1557–1562. doi: 10.1007/s40572-017-0155-y.

Day, T. F. *et al.* (2005) 'Wnt/Beta-Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis', *Developmental Cell*, 8, pp. 739–750. doi: 10.1016/j.devcel.2005.03.016.

Froy, O. and Chapnik, N. (2007) 'Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine', *Molecular Immunology*, 44, pp. 1954–1960. doi: 10.1016/j.molimm.2006.09.026.

Gammons, M. V. *et al.* (2016) 'Wnt Signalosome Assembly by DEP Domain Swapping of Dishevelled', *Molecular Cell*. MRC Laboratory of Molecular Biology, 64(1), pp. 92–104. doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.026.

\*Gesta, S., Tseng, Y. H. and Kahn, C. R. (2007) 'Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source', *Cell*, 131(2), pp. 242–256. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.004.

Geyfman, M. *et al.* (2012) 'Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) controls circadian cell proliferation and susceptibility to UVB-induced DNA damage in the epidermis', *PNAS*, 109(29), pp. 11758–11763. doi: 10.1073/pnas.1209592109.

Glass II, D. A. *et al.* (2005) 'Canonical Wnt Signaling in Differentiated Osteoblasts Controls Osteoclast Differentiation', *Developmental Cell*, 8, pp. 751–764. doi: 10.1016/j.devcel.2005.02.017.

Gréchez-Cassiau, A. *et al.* (2008) 'The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21 WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation', *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), pp. 4535–4542. doi: 10.1074/jbc.M705576200.

Guo, B. *et al.* (2012) 'The clock gene, brain and muscle Arnt-like 1, regulates adipogenesis via Wnt signaling pathway', *The FASEB Journal*, 26(8), pp. 3453–3463. doi: 10.1096/fj.12-205781.

\*Harfmann, B. D., Schroder, E. A. and Esser, K. A. (2015) 'Circadian Rhythms, the Molecular Clock, and Skeletal Muscle', *Journal of Biological Rhythms*, 30(2), pp. 84–94. doi: 10.1177/0748730414561638.Circadian.

He, Y. *et al.* (2013) 'Roles of brain and muscle ARNT-like 1 and Wnt antagonist Dkk1 during osteogenesis of bone marrow stromal cells', *Cell Proliferation*, 46(6), pp. 644–653. doi: 10.1111/cpr.12075.

He, Y. *et al.* (2015) 'Overexpression of the circadian clock gene *Rev-erba* affects murine bone mesenchymal stem cell proliferation and osteogenesis', *Stem Cells and Development*, 24(10), pp. 1194–1204. doi: 10.1089/scd.2014.0437.

Hoogerwerf, W. A. *et al.* (2007) 'Clock Gene Expression in the Murine Gastrointestinal Tract: Endogenous Rhythmicity and Effects of a Feeding Regimen', *Gastroenterology*, 133, pp. 1250–1260. doi: 10.1053/j.gastro.2007.07.009.

Huang, J. *et al.* (2015) 'Circadian modulation of dopamine levels and dopaminergic neuron development contributes to attention deficiency and hyperactive behavior', *Journal of Neuroscience*, 35(6), pp. 2572–2587. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2551-14.2015.

Huelsken, J. *et al.* (2001) ' $\beta$ -Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin', *Cell*, 105(4), pp. 533–545. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00336-1.

Janich, P. *et al.* (2011) 'The circadian molecular clock creates epidermal stem cell heterogeneity', *Nature*, 480(7376), pp. 209–214. doi: 10.1038/nature10649.

Janich, P. *et al.* (2013) 'Human Epidermal Stem Cell Function Is Regulated by Circadian Oscillations', *Stem Cell*. Elsevier Inc., 13(6), pp. 745–753. doi: 10.1016/j.stem.2013.09.004.

\*Katsimbri, P. (2017) 'The biology of normal bone remodelling', *European journal of cancer care*, 26(6). doi: 10.1111/ecc.12740.

King, D. P. *et al.* (1997) 'Positional cloning of the mouse circadian Clock gene', *Cell*, 89(4), pp. 641–653. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80245-7.

Kioussi, C. *et al.* (2002) 'Identification of a Wnt/Dvl/Beta-Catenin  $\rightarrow$  Pitx2 Pathway Mediating Cell-Type-Specific Proliferation during Development', *Cell*, 111(5), pp. 673–685. doi: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01084-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01084-x).

Kubo, T. *et al.* (2006) 'Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: Findings from the Japan Collaborative Cohort Study', *American Journal of Epidemiology*, 164(6), pp. 549–555. doi: 10.1093/aje/kwj232.

Lapid, K. *et al.* (2013) 'GSK3 $\beta$  regulates physiological migration of stem/progenitor cells via cytoskeletal rearrangement', *The Journal of Clinical Investigation*, 123(4), pp. 1705–1717. doi: 10.1172/JCI64149DS1.

- \*Lecarpentier, Y. *et al.* (2019) ‘Multiple Targets of the Canonical WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling in Cancers’, *Frontiers in Oncology*, 9(November), pp. 1–17. doi: 10.3389/fonc.2019.01248.
- \*Lie, D. C. *et al.* (2004) ‘Neurogenesis InThe Adult Brain: New Strategies for Central Nervous System Diseases’, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, pp. 399–421. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121631.
- Lin, F. *et al.* (2013) ‘Over-expression of circadian clock gene Bmal1 affects proliferation and the canonical Wnt pathway in NIH-3T3 cells’, *Cell Biochemistry and Function*, 31(2), pp. 166–172. doi: 10.1002/cbf.2871.
- Lin, K. K. *et al.* (2009) ‘Circadian Clock Genes Contribute to the Regulation of Hair Follicle Cycling’, *PLOS Genetics*, 5(7). doi: 10.1371/journal.pgen.1000573.
- Longo, K. A. *et al.* (2004) ‘Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues’, *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), pp. 35503–35509. doi: 10.1074/jbc.M402937200.
- \*Lowrey, P. L. and Takahashi, J. S. (2011) *Genetics of circadian rhythms in mammalian model organisms*. 1st edn, *Advances in Genetics*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4.
- Lowry, W. E. *et al.* (2005) ‘Defining the impact of  $\beta$ -catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells’, *Genes and Development*, 19(13), pp. 1596–1611. doi: 10.1101/gad.1324905.
- \*Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009) ‘Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm’, *Nature Reviews Cancer*, 9(3), pp. 153–166. doi: 10.1038/nrc2602.
- \*Masri, S. and Sassone-Corsi, P. (2010) ‘Plasticity and specificity of the circadian epigenome’, *Nature Neuroscience*, 13(11), pp. 1324–1329. doi: 10.1038/nn.2668.
- \*Massagué, J. (2004) ‘G1 cell-cycle control and cancer’, *Nature*, 432(November), pp. 298–306.
- Matsu-ura, T. *et al.* (2016) ‘Intercellular Coupling of the Cell Cycle and Circadian Clock in Adult Stem Cell Culture’, *Mol Cell*, 64(5), pp. 900–912. doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.015.

- \*Matsu-ura, T., Moore, S. R. and Hong, C. I. (2018) 'WNT Takes Two to Tango: Molecular Links between the Circadian Clock and the Cell Cycle in Adult Stem Cells', *Journal of Biological Rhythms*, 33(1), pp. 5–14. doi: 10.1177/0748730417745913.
- McMahon, A. P. and Moon, R. T. (1989) 'Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis', *Cell*, 58(6), pp. 1075–1084. doi: 10.1016/0092-8674(89)90506-0.
- Méndez-Ferrer, S. *et al.* (2008) 'Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations', *Nature*, 452, pp. 442–448. doi: 10.1038/nature06685.
- \*Ming, G. and Song, H. (2005) 'Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System', *Annu. Rev. Neurosci.*, 28, pp. 223–250. doi: 10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459.
- Moore, S. R. *et al.* (2014) 'Robust circadian rhythms in organoid cultures from Period2::Luciferase mouse small intestine', *DMM Disease Models and Mechanisms*, 7(9), pp. 1123–1130. doi: 10.1242/dmm.014399.
- \*Morrison, S. J. and Scadden, D. T. (2014) 'The bone marrow niche for haematopoietic stem cells', *Nature*, 505, pp. 327–334. doi: 10.1038/nature12984.
- Nagoshi, E. *et al.* (2004) 'Circadian Gene Expression in Individual Fibroblasts: Cell-Autonomous and Self-Sustained Oscillators Pass Time to Daughter Cells', *Cell*, 119, pp. 693–705.
- Nusse, R. and Varmus, H. E. (1982) 'Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome', *Cell*, 31(1), pp. 99–109. doi: 10.1016/0092-8674(82)90409-3.
- Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980) 'Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*', *Nature*, 287(5785), pp. 795–801. doi: 10.1038/287795a0.
- Otway, D. T., Frost, G. and Johnston, J. D. (2009) 'Circadian rhythmicity in murine pre-adipocyte and adipocyte cells', *Chronobiology International*, 26(7), pp. 1340–1354. doi: 10.3109/07420520903412368.
- Polidarová, L. *et al.* (2009) 'Temporal Gradient in the Clock Gene and Cell-Cycle Checkpoint Kinase Wee1 Expression along the Gut', *Chronobiology International*, 26(4), pp. 607–620. doi: 10.1080/07420520902924889.



Preitner, N. *et al.* (2002) 'The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator', *Cell*, 110(2), pp. 251–260. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00825-5.

Qu, Q. *et al.* (2010) 'Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/Beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal', *Nat Cell Biol.*, 12(1), pp. 31–39. doi: 10.1038/ncb2001.Orphan.

Ralph, M. R. *et al.* (1990) 'Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period', *Science*, 247(4945), pp. 975–978.

\*Rea, M. A. (1998) 'Photic Entrainment of Circadian Rhythms in rodents', *Chronobiology International*, 15(5), pp. 395–423. doi: 10.3109/07420529808998699.

Rey, G. *et al.* (2011) 'Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver', *PLoS Biology*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pbio.1000595.

Reya, T. *et al.* (2003) 'A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells', *Nature*, 423, pp. 409–414. doi: 10.1038/nature01593.

Rosen, E. D. *et al.* (1999) 'PPAR $\gamma$  is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro', *Molecular Cell*, 4, pp. 611–617. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80211-7.

Ross, S. E. *et al.* (2000) 'Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling', *Science*, 289(5481), pp. 950–953. doi: 10.1126/science.289.5481.950.

\*Rudnicki, M. A. and Williams, B. O. (2016) 'Wnt Signaling in Bone and Muscle', *Bone*, 80, pp. 60–66. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.009.Wnt.

Sato, T. *et al.* (2009) 'Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche', *Nature*. Nature Publishing Group, 459, pp. 262–265. doi: 10.1038/nature07935.

Sato, T. *et al.* (2011) 'Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts', *Nature*. Nature Publishing Group, 469(7330), pp. 415–418. doi: 10.1038/nature09637.

Sato, T. K. *et al.* (2004) 'A functional genomics strategy reveals rora as a component of the mammalian circadian clock', *Neuron*, 43(4), pp. 527–537. doi: 10.1016/j.neuron.2004.07.018.

\*Schafer, K. A. (1998) 'The Cell Cycle: A Review', *Vet Pathol*, 35(6), pp. 461–478. doi: 10.1177/030098589803500601.

\*Scheving, L. A. (2000) 'Biological Clocks and the Digestive System', *Gastroenterology*, 119, pp. 536–549. doi: 10.1053/gast.2000.9305.

Scheving, L. E. *et al.* (1978) 'Circadian variation in cell division of the mouse alimentary tract, bone marrow and corneal epithelium', *The Anatomical Record*, 191, pp. 479–486. doi: 10.1002/ar.1091910407.

\*Schibler, U., Ripperger, J. and Brown, S. A. (2003) 'Peripheral Circadian Oscillators in Mammals: Time and Food', *Journal of Biological Rhythms*, 18(3), pp. 250–260. doi: 10.1177/0748730403253381.

Schwarz-Romond, T. *et al.* (2007) 'The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization', *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(6), pp. 484–492. doi: 10.1038/nsmb1247.

Sharma, R. P. (1973) 'Wingless a new mutant in *Drosophila melanogaster*', *Drosophila Information Service*, p. 134. Available at: <http://repository.ias.ac.in/71006/1/71006.pdf>.

\*Shostak, A. (2017) 'Circadian clock, cell division, and cancer: From molecules to organism', *International Journal of Molecular Sciences*, 18. doi: 10.3390/ijms18040873.

\*Sinturel, F., Petrenko, V. and Dibner, C. (2020) 'Circadian Clocks Make Metabolism Run', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.jmb.2020.01.018.

Sládek, M. *et al.* (2007) 'Insight Into the Circadian Clock Within Rat Colonic Epithelial Cells', *Gastroenterology*, 133, pp. 1240–1249. doi: 10.1053/j.gastro.2007.05.053.

\*Soták, M., Sumová, A. and Pácha, J. (2014) 'Cross-talk between the circadian clock and the cell cycle in cancer', *Annals of Medicine*, 46(4), pp. 221–232. doi: 10.3109/07853890.2014.892296.

Stamos, J. L. *et al.* (2014) 'Structural basis of GSK-3 inhibition by N-terminal phosphorylation and by the Wnt receptor LRP6', *eLife*, 2014(3). doi: 10.7554/eLife.01998.

Sun, S. *et al.* (2018) 'Knocking down clock control gene CRY1 decreases adipogenesis via canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 506(3), pp. 746–753. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.134.

Sun, Z. S. *et al.* (1997) 'RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene', *Cell*, 90(6), pp. 1003–1011. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80366-9.

\*Takahashi, J. S. *et al.* (2008) 'The Genetics of Mammalian Circadian Order and Disorder: Implications for Physiology and Disease', *Nat Rev Genet*, 9(10), pp. 764–775. doi: 10.1038/nrg2430.The.

Tamai, S., Sanada, K. and Fukada, Y. (2008) 'Time-of-Day-Dependent Enhancement of Adult Neurogenesis in the Hippocampus', *PLoS ONE*, 3(12). doi: 10.1371/journal.pone.0003835.

\*Tsuchiya, Y., Umemura, Y. and Yagita, K. (2020) 'Circadian clock and cancer: From a viewpoint of cellular differentiation', *International Journal of Urology*. doi: 10.1111/iju.14231.

Turek, F. W. *et al.* (2005) 'Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice', *Science*, 308(5724), pp. 1043–1045. doi: 10.1126/science.1108750.Obesity.

Wang, N. *et al.* (1995) 'Impaired Energy Homeostasis in C/EBP $\alpha$  Knockout Mice', *Science*, 269, pp. 1108–1112. doi: 10.1126/science.7652557.

\*Weger, M. *et al.* (2017) 'Stem cells and the circadian clock', *Developmental Biology*. Elsevier Inc., 431(2), pp. 111–123. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.09.012.

Woelfle, M. A. *et al.* (2004) 'The Adaptive Value of Circadian Clocks: An Experimental Assessment in Cyanobacteria', *Current Biology*, 14, pp. 1481–1486. doi: 10.1016/j.cub.2004.08.023.

Yagita, K. *et al.* (2010) 'Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro', *PNAS*, 107(8), pp. 3846–3851. doi: 10.1073/pnas.0913256107.

Yamanishi, K. *et al.* (2019) 'A direct heterotypic interaction between the DIX domains of Dishevelled and Axin mediates signaling to  $\beta$ -catenin', *Science Signaling*, 12. doi: 10.1126/scisignal.aaw5505.

Yasuniwa, Y. *et al.* (2010) 'Circadian Disruption Accelerates Tumor Growth and Angio/Stromagenesis through a Wnt Signaling Pathway', *PLoS ONE*, 5(12). doi: 10.1371/journal.pone.0015330.

Yin, L. *et al.* (2006) 'Nuclear Receptor Rev-erba Is a Critical Lithium-Sensitive Component of the Circadian Clock', *Science*, 311, pp. 1002–1005. doi: 10.1126/science.1121613.

Yu, Y. *et al.* (2018) 'Cryptochrome 2 (CRY2) suppresses proliferation and migration and regulates clock gene network in osteosarcoma cells', *Medical Science Monitor*, 24, pp. 3856–3862. doi: 10.12659/MSM.908596.

Yuan, G. *et al.* (2017) 'The Circadian Gene Clock Regulates Bone Formation Via PDIA3', *Journal of Bone and Mineral Research*, 32(4), pp. 861–871. doi: 10.1002/jbmr.3046.

\*Zhan, T., Rindtorff, N. and Boutros, M. (2017) 'Wnt signaling in cancer', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 36, pp. 1461–1473. doi: 10.1038/onc.2016.304.

Zhang, H. *et al.* (2011) 'Adipocytes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Exert Inhibitory Effects on Osteoblastogenesis', *Current Molecular Medicine*, 11(6), pp. 489–502. doi: 10.2174/156652411796268704.

Zhou, L. *et al.* (2018) 'Cryptochrome 1 promotes osteogenic differentiation of human osteoblastic cells via Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling', *Life Sciences*. Elsevier, 212, pp. 129–137. doi: 10.1016/j.lfs.2018.09.053.

Zhou, P. *et al.* (1995) 'Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate', *Genes and Development*, 9(6), pp. 570–583.

Zhu, Z. *et al.* (2016) 'CLOCK promotes 3T3-L1 cell proliferation via Wnt signaling', *IUBMB Life*, (4), pp. 557–568. doi: 10.1002/iub.1512.

\* souhrnná práce

## Knižní zdroje:

ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, David Owen MORGAN, Martin C. RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. New York: Garland Science, Taylor and Francis Group, [2015]. ISBN 978-0-8153-4464-3.